

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lyon, délivré par l'École Normale Supérieure de Lyon

Discipline : Science de la Vie

Laboratoire : Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule

École Doctorale BIOLOGIE MOLÉCULAIRE, INTÉGRATIVE ET CELLULAIRE (BMIC)

présentée et soutenue publiquement le 09 Décembre 2015

par Madame Soizic RICHE

**Étude comparative du positionnement du fuseau mitotique dans les espèces
C. elegans et *C. briggsae***

Directeur de thèse : Mme Marie DELATTRE

Après l'avis de :

Mme Monica GOTTA
M. Xavier MORIN

Devant le jury composé de :

Mme Janet CHENEVERT, Laboratoire de Biologie du Développement de Villefranche-sur-Mer, Examineur

Mme Marie DELATTRE, Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Directeur de Thèse

Mme Monica GOTTA, Université de Genève, Rapporteur

M. Xavier MORIN, Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure – ENS Paris, Rapporteur

Remerciements

Je souhaite remercier tout d'abord Janet Chenevert, Monica Gotta et Xavier Morin qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail.

Je souhaite ensuite remercier Marie Delattre, ma directrice de thèse. Merci d'être aussi passionnée et merci de rendre la recherche fondamentale aussi attractive. Bien que cela ne soit pas toujours facile, ce sont des personnes comme toi qui savent mettre en avant cette science qui est, nous le savons, la base ! Je pense sincèrement que si je ne t'avais pas rencontrée je n'aurai pas fait cette thèse. Tout ce que je sais aujourd'hui, je l'ai appris dans ton équipe, et j'espère que beaucoup d'autres étudiants bénéficieront de tes conseils et de ton soutien. Merci pour tout.

L'équipe Delattre a vu beaucoup de personnes aller et venir et je citerai en premier les dernières « survivor » de l'équipe, Wallis et Caroline. Merci les filles pour votre bonne humeur, votre « pipletterie » et surtout vos encouragements lors de la dernière ligne droite ! (Merci aussi de m'avoir supportée les jours où je m'étais levée du pied gauche ;)).

Aurore, au premier abord très discrète, mais qui en fait cache bien son jeu ☺.

Mélissa dont le franc-parler n'est plus un secret pour personne. Je ne saurais dire à qui tu as le plus manqué quand tu es partie ? À Marie, qui a beaucoup regretté ta fulgurante efficacité, ou à moi, qui ne t'avais plus pour t'écouter revandiquer des milliards de choses ! Merci d'avoir été là pour terminer le papier, sans ton aide je serais sûrement encore en train de faire des IF ! Je te souhaite beaucoup de bonnes choses pour l'avenir.

Guillaume et Claire, vous êtes l'une de mes plus belles rencontres. La vie a ses hauts et ses bas et vous me donnez le sentiment que chaque obstacle peut être franchi. Peu importe la situation, on peut toujours avancer. Vous êtes des personnes pleines de qualités (oui oui même Guillaume :p) et je suis fière de faire partie de vos amis.

Noémie, tu resteras à jamais mon jeune padawan et c'est clairement moi qui aie gagné le concours du plus beau champignon mignon !

Enfin Manon, tu es la relève de l'équipe Delattre ! Je sais que tu vas tout déchirer ;) même si on sait très bien que « c'est moi la plus drôle » !!

Je remercie également les membres de l'équipe Palladino, passés et présents, qui ont pour beaucoup participé à la bonne humeur du labo. Lucie, Steven et Clément ... Comment résister à un Danish ou à un Cul de Chouette ? Les fous rires, les week-ends et les soirées resteront à jamais gravés...

Moumouth ! arrivée un peu plus tard mais tu as vite su rattraper le temps perdu ! Je te souhaite de trouver un environnement professionnel dans lequel tu t'épanouiras autant que chez Francesca (tu es sûre que tu ne veux pas faire une thèse ? (;p)).

Je remercie également la team Yvert et plus particulièrement Fabien ! On aura galérer ensemble jusqu'à la fin (Toi plus que moi :p)! Félicitation encore pour ta nouvelle vie de papa ! J'espère que ta fille ne trouvera pas trop ringard « Retour vers le Future » ou « Star Wars », j'imagine déjà les week-ends en famille qui l'attendent !

Enfin je remercie Esther. Tu as toujours été là quand j'en ai eu besoin. Je me souviendrais toujours de notre tête à tête à l'Indo, qui, malgré les circonstances, a été une soirée parfaite grâce à toi (et aux cocktail de Tété...).

Venir travailler n'aurait vraiment pas été pareil sans vous tous, faire ce que l'on aime dans la bonne humeur est, à mon sens, quelque chose d'assez exceptionnel.

Aussi incroyable que cela puisse paraître il y a également une vie en dehors du labo ☺. Parmi ces personnes je souhaite bien sûr remercier ma famille, et notamment mes parents, sans qui je n'aurais pas fait toutes ces études. Merci de vous être occupés de moi jusqu'à ce que je puisse enfin quitter le nid ! J'ai mis du temps, mais j'y suis enfin arrivée !

Merci à ma sœur Gaëlle et à Antoine. Je ne sais pas si les plantes y sont pour quelque chose mais on se sent bien chez vous. C'est toujours un plaisir de venir vous voir. Merci de vous être occupés de moi pendant ma lecture intensive de biblio ! Merci à Estéban d'être le plus gentil des neveux (pour l'instant ;-)), et qui a la chance d'avoir une tata extraordinaire ☺.

Merci à ma chouchou Estelle, on ne s'est pas beaucoup vu ces derniers temps mais tu seras toujours toi, et te voir, même que deux fois par an, me fais toujours un bien fou. J'espère vraiment qu'on arrivera toujours à se voir même si je pars à l'autre bout de la Terre.

Merci à Isa et JP. Merci de m'avoir accueillie chez vous si souvent, et de m'avoir emmenée en vacances ! Mon rôle de « Kad » me manque un peu parfois ;) .

Je remercie Benjamin et Philippe chez qui je n'aurai jamais de scrupules à m'inviter que ce soit à l'Île de Ré, à Cluses, à Tossiat ou encore à l'Île Maurice qui sait... C'est toujours un plaisir de passer du temps avec vous et peu importe où l'on finira vous serez toujours les bienvenus.

Comme on dit « last but not least », je remercie en dernier Jonathan. Ton soutien a été essentiel. Merci d'être comme tu es et merci de t'occuper si bien de moi tous les jours. Je sais que j'ai beaucoup de chance.

TABLE DES MATIÈRES

<u>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</u>	<u>6</u>
<u>LISTE DES FIGURES.....</u>	<u>8</u>
<u>LISTE DES TABLEAUX</u>	<u>10</u>
<u>CONTEXTE SCIENTIFIQUE</u>	<u>11</u>
<u>INTRODUCTION.....</u>	<u>13</u>
<u>I. LA DIVISION CELLULAIRE ASYMÉTRIQUE ET LE POSITIONNEMENT DU FUSEAU MITOTIQUE.....</u>	<u>14</u>
I.A. MÉCANISME GÉNÉRAL DU POSITIONNEMENT DU FUSEAU MITOTIQUE.....	21
I.B. LA DIVISION ASYMÉTRIQUE CHEZ LA DROSOPHILE	24
I.B.1. MISE EN ÉVIDENCE DE LA VOIE GAI/PINS/MUD.....	24
I.B.2. MUD FAIT LE LIEN ENTRE DOMAINE CORTICAL ET POSITIONNEMENT DU FUSEAU	28
I.B.3. MISE EN ÉVIDENCE DU COMPLEXE PINS/DLG/KHC-73.....	29
I.B.4. RÉGULATION DES VOIES DE POSITIONNEMENT DU FUSEAU MITOTIQUE	33
I.B.5. CONCLUSION SUR L'ÉTUDE DE LA DIVISION ASYMÉTRIQUE CHEZ LA DROSOPHILE	34
I.C. POSITIONNEMENT DU FUSEAU MITOTIQUE DANS DES CELLULES DE VERTÉBRÉS	36
I.C.1. IDENTIFICATION DU COMPLEXE GAI/LGN/NUMA.....	37
I.C.2. UN COMPLEXE, DEUX ORIENTATIONS	40
I.C.3. CONCLUSION SUR LE POSITIONNEMENT DU FUSEAU CHEZ LES VERTÉBRÉS	42
I.D. CONCLUSION	42
<u>II. LA DIVISION ASYMÉTRIQUE DANS L'EMBRYON DE CAENORHABDITIS ELEGANS.....</u>	<u>43</u>
II.A. CAENORHABDITIS ELEGANS : ORGANISME MODÈLE	43
II.B. MISE EN PLACE DE LA POLARITÉ CELLULAIRE DANS L'EMBRYON DE C. ELEGANS.....	47
II.B.1. INITIATION DE LA POLARISATION DANS L'EMBRYON DE C. ELEGANS	49
II.B.2. CONTRACTILITÉ DU RÉSEAU D'ACTOMYOSINE ET POLARISATION.....	51
II.C. LA POLARISATION EST TRADUITE EN FORCES ASYMÉTRIQUES POUR POSITIONNER LE FUSEAU MITOTIQUE	56
II.C.1. PROTÉINES INTERVENANT DANS LE MÉCANISME DE POSITIONNEMENT	57
II.C.2. DIVERGENCES ENTRE LES COMPLEXES GÉNÉRATEUR DE FORCE DE DROSOPHILE ET VERTÉBRÉS AVEC CELUI DE C. ELEGANS.....	62
II.C.3. RÉGULATION DES PROTÉINES G HÉTÉROTRIMÉRIQUES	63
II.D. RÉGULATION SPATIALE ET TEMPORELLE DES FORCES DE TRACTION	66

II.D.1. POSITIONNEMENT CENTRAL DU COMPLEXE NOYAUX/CENTROSOMES (NCC).....	68
II.D.2. POSITIONNEMENT POSTÉRIEUR DU FUSEAU MITOTIQUE	71
II.D.3. OSCILLATIONS DES PÔLES DU FUSEAU : FORCE DE TRACTION VS FORCE DE PROPULSION	75
II.D.4. CONCLUSION	78
III. CONSERVATION DE LA DIVISION ASYMÉTRIQUE CHEZ LES NÉMATODES	79
III.A. ÉTUDES DÉVELOPPEMENTALES PAR ANALYSES COMPARATIVES	79
III.B. LE POSITIONNEMENT DU FUSEAU CHEZ LES NÉMATODES	82
III.B.1. LES NÉMATODES, MODÈLES D'ÉTUDE POUR LA PREMIÈRE DIVISION DE L'EMBRYON.....	82
III.B.2. COMPARAISON DES NÉMATODES <i>C. ELEGANS</i> ET <i>C. BRIGGSÆ</i>	84
III.B.3. UNE DIVISION, DEUX MÉCANISMES ?	86
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	89
I. SOUCHES DE NÉMATODE	90
II. CLONAGES MOLÉCULAIRES	94
II.A. CLONAGES PAR ENZYME DE RESTRICTION	94
II.A.1. PLASMIDES POUR RNAI	94
II.A.2. PLASMIDES DE TRANSGÉNÈSE PAR BOMBARDEMENT	95
II.A.3. PLASMIDES DE DOUBLE HYBRIDE	95
II.A.4. PLASMIDES POUR PURIFICATION DE PROTÉINES	96
II.B. CLONAGES PAR GATEWAY MULTISITE	96
III. TRANSGÉNÈSE	98
III.A. LIGNÉES CRÉÉES PAR BOMBARDEMENT	98
III.B. LIGNÉES CRÉÉES PAR MICROINJECTION (MosSCI, MINIMos)	99
IV. INACTIVATION DES GÈNES PAR RNAI	101
V. IMAGERIE.....	102
V.A. FILMS EN DIC	102
V.B. CONFOCAL SPINNING DISK.....	103
V.C. CONFOCAL LSM 710.....	103
V.D. TRACKING DES CENTROSOMES	103
V.D.1. TRACKING MANUEL	103

V.D.2. TRACKING AUTOMATIQUE	104
VI. PRODUCTION D'ANTICORPS	104
VII. MARQUAGE PAR IMMUNOFLUORESCENCE	105
VII.A. FIXATION.....	105
VII.B. MARQUAGE	105
VII.C. QUANTIFICATION DU NIVEAU CORTICAL DE GPR.....	106
VIII. WESTERN BLOT	106
IX. DOUBLE HYBRIDE	107
X. STATISTIQUES.....	107
RÉSULTATS/ DISCUSSIONS	108
CHAPITRE 1: LES EMBRYONS DE <i>C. BRIGGSIAE</i> RÉVÈLENT UN CONTRÔLE POSITIONNEL DES OSCILLATIONS DU FUSEAU MITOTIQUE ÉVOLUTIVEMENT CONSERVÉ.	109
I. INTRODUCTION	109
II. RÉSULTATS	111
II.A. UNE POSITION INTRACELLULAIRE CRITIQUE DICTE LE DÉMARRAGE DES OSCILLATIONS DU CENTROSOME POSTÉRIEUR DANS LES DEUX ESPÈCES	111
II.B. LE CONTRÔLE SPATIAL DU DÉMARRAGE DES OSCILLATIONS CORRÈLE AVEC LA LIMITE POSTÉRIEURE DU DOMAINE GPR.....	112
II.C. LA LIMITE POSTÉRIEURE DU DOMAINE DE GPR CONTRÔLE LE DÉMARRAGE DES OSCILLATIONS.....	113
II.D. LE NIVEAU DE GPR ET LA DURÉE DES OSCILLATIONS CONTRÔLENT L'AMPLITUDE DES OSCILLATIONS	113
II.E. LE POOL ANTÉRIEUR DE GPR EST RESPONSABLE DE L'OVERCENTRATION EN PROPHASE MAIS EST INACTIF EN ANAPHASE CHEZ <i>C. BRIGGSIAE</i>	113
III. DISCUSSION/ CONCLUSION.....	129
CHAPITRE 2: ÉVOLUTION FONCTIONNELLE DE GPR ; IDENTIFICATION DES DOMAINES RÉGULATEURS CLÉS.	132
I. INTRODUCTION	132

II. RÉSULTATS	134
II.A. EXPÉRIENCE DE REMPLACEMENT DE GÈNE	134
II.A.1. <i>CBR-GPR-2</i> EST FONCTIONNEL DANS <i>C. ELEGANS</i>	134
II.A.2. LE PHÉNOTYPE DE <i>Ce + CbGPR</i> EST IDENTIQUE À CELUI D'UNE LIGNÉE <i>Ce + CEGPR</i>	138
II.A.3. <i>Ce-GPR-2</i> A UN EFFET DOMINANT NÉGATIF DANS <i>C. BRIGGSÆ</i>	139
II.A.4. <i>Cb-GPR-2</i> N'EST PAS SUFFISANT POUR INDUIRE DE L'OVERCENTRATION.....	143
II.A.5. LES PROTÉINES GPR ET LIN-5 SEMBLANT AVOIR CO-ÉVOLUÉES DANS LES DEUX ESPÈCES	145
II.A.6. LES TRANSGÈNES PEUVENT SE LOCALISER SANS LA PROTÉINE LIN-5 ENDOGÈNE.....	146
II.A.7. QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES TRANSGÈNES DANS CHAQUE LIGNÉE	147
II.B. CRÉATION DE PROTÉINES CHIMÈRES.....	149
II.B.1. <i>NTer-Cb/CTer-Ce-GPR</i> EST FONCTIONNEL DANS <i>C. ELEGANS</i>	150
II.B.2. <i>NTer-Cb/CTer-Ce-GPR</i> N'A PAS L'EFFET DOMINANT NÉGATIF DE <i>Ce-GPR-2</i> DANS <i>C. BRIGGSÆ</i>	151
II.B.3. L'OVERCENTRATION POURRAIT DÉPENDRE DE LA PARTIE CTER DE <i>Cb-GPR-2</i>	152
III. DISCUSSION	154
III.A. SURACTIVATION DES OSCILLATIONS DU CENTROSOME ANTÉRIEUR DANS <i>C. ELEGANS</i>	154
III.B. L'OVERCENTRATION POURRAIT ÊTRE CONTRÔLÉE PAR UN DOMAINE DE <i>Cb-GPR-2</i>	156
III.C. CONCLUSION	157
CHAPITRE 3: PROJETS EN PERSPECTIVE ET DONNÉES PRÉLIMINAIRES.....	158
I. ÉTUDE DE LA DYNAMIQUE DE GPR.....	158
I.A. OPTOGÉNÉTIQUE	158
I.B. SILENCING.....	160
CHAPITRE 4 : AUTOMATISATION DU TRACKING DES PÔLES DU FUSEAU MITOTIQUE À PARTIR DE FILMS EN DIC.....	163
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	180
BIBLIOGRAPHIE	182
ABSTRACT	193
RÉSUMÉ	194

Liste des Abréviations

3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazole
ADN/ARN db	Acide Desoxy/Ribonucléique double brin
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
AGS	Activators of G protein Signaling
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APC	Anaphase Promoting Complex
aPKC	atypical Protein Kinase C
ARN	Acide RiboNucléique
<i>aspm-1</i>	<i>abnormal spindle-like microcephaly-associated protein 1</i>
Baz	Bazooka
CAI	Codon Adaptation Index
<i>C. elegans/briggsae</i>	<i>Caenorhabditis elegans/briggsae</i>
CDK	Cycline Dependant Kinase
CGC	Caenorhabditis Genetics Center
Cter	C- terminal
Ctp	Cut up
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DEP	Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin domain
<i>dhc-1</i>	<i>dynein heavy chain 1</i>
DIC	Dyneine Intermediate Chain
DIC microscopie	Contraste Interférentiel Différentiel
<i>dlc-1</i>	<i>dynein light chain 1</i>
Dlg	Disc large
Dsh	Dishevelled
DSD	Dérive des Systèmes Développementaux
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ed	Echinoid
FG	Générateurs de force
FRET	Fluorescence Recovery after Energy Transfer
Fz	Frizzled
GAP	GTPase-Activating Protein
GDI	Guanine Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GK	domaine Kinase Guanylé
GMC	Ganglion Mother Cell
GPR	G Protein Regulator
GST	Glutathione S-Transferase
GTP	Guanosine TriPhosphate

GTPyS	Guanosine 5'-O-[gamma-thio]TriPhosphate
HTT	HunTingTine
Insc	Inscuteable
IPTG	IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside
Khc-73	Kinesin heavy chain 73
LGN	Leu-Gly-Asn repeat-enriched
<i>lis-1</i>	<i>lissencephaly-1</i>
MAGUK	Membrane Associated GUanylated Kinase
mat	metaphase to anaphase transition
<i>mcph</i>	<i>primary microcephaly</i>
Mir	Miranda
MLC-4	Myosine regulatory Light Chain 4
MOE	Moesin
MTOC	MicroTubule Organizing Center
Mud	Mushroom body defect
NB	NeuroBlaste
NCC	Nuclei Centrosome Complex
<i>nde-1</i>	<i>nudE neurodevelopment protein 1</i>
NGM	Nematode Growth Medium
NMY-2	Non-muscle MYosin 2
Nter	N- terminal
NuMA	Nuclear Mitotic Apparatus protein
OICD	Optical Induced Centrosome Destruction
PAR	PARtitioning defective
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	PBS-Tween
PCM	PeriCentriolar Material
Pins	Partner of inscuteable
PKC-3	Protein Kinase C 3
Pros	Prospéro
RIC	Resistance to Inhibitors of Cholinesterase
RNAi	RNA interference
<i>sas-4</i>	<i>spindle assembly abnormal protein 4</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD-LW	Synthetic Dropout without Leucine and Tryptophan
SD-LWAdé	SD without LW and Adénosine
SD-LWH	SD without LW and Histidine
SOP	Sensory Organ Precursor
TPR	TétratrigoPeptide Repeat
VHL	Von Hippel Lindau
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Liste des Figures

Figure 1: Positionnement du plan de clivage d'une cellule par rapport à un axe de polarité.	15
Figure 2: Conséquences de l'orientation du plan de clivage d'une cellule en division au sein d'un tissu.	16
Figure 3: Schéma du fuseau.	17
Figure 4: Phase proliférative et phase neurogénique des cellules souches neurales lors du développement du système nerveux.....	20
Figure 5: Un complexe protéique cortical permet d'interagir avec les microtubules pour positionner le fuseau mitotique.....	23
Figure 6: Positionnement du fuseau mitotique dans un neuroblaste (NB) de drosophile.....	25
Figure 7: Conséquences d'un défaut d'orientation du fuseau mitotique lors de la division du Neuroblaste (NB).....	26
Figure 8: Interactions des protéines intervenant dans le positionnement du fuseau du neuroblaste de drosophile.	27
Figure 9: Phénotype de <i>Telophase Rescue</i> dans des neuroblastes (NB) de drosophile.	28
Figure 10: Positionnement du fuseau mitotique dans des cellules SOP de drosophile.	30
Figure 11: Bilan des mécanismes de positionnement du fuseau chez la drosophile.	32
Figure 12 : Pins possède une interaction intramoléculaire via ses domaines TPR et GoLoco.	33
Figure 13: Système Echinoid dans des cellules S2 de drosophile.	35
Figure 14: Les cellules MDCK s'organisent en kystes lorsqu'elles sont cultivées en Matrigel.	36
Figure 15: Interaction des protéines intervenant dans le positionnement du fuseau chez les vertébrés.	37
Figure 16: Cycle de développement d'un embryon de <i>C. elegans</i> au stade adulte.	44
Figure 17: Photo d'un nématode <i>C. elegans</i> hermaphrodite adulte en optique DIC.	45
Figure 18: Clichés de la première division embryonnaire de <i>C. elegans</i> filmé en optique DIC x100.	46

Figure 19: Mise en place de la polarité dans l'embryon de <i>C. elegans</i> au cours de la première division asymétrique.	48
Figure 20: Schéma d'une gonade de <i>C. elegans</i>	49
Figure 21: Réseaux de microtubules et d'actomyosine dans l'embryon de <i>C. elegans</i>	52
Figure 22: Moyenne de l'augmentation des pics de vitesse de déplacement des centrosomes après rupture du fuseau par un laser.	57
Figure 23: Modèle d'activation des Galpha dans le mécanisme de positionnement du fuseau.	66
Figure 24: Modèles de positionnement du complexe Noyau/Centrosome (NCC) lors de la prophase.	68
Figure 25 : Modèle proposé par Gusnowski et Srayko pour le positionnement du noyau et du fuseau.	71
Figure 26: Localisation de LET-99 et définition des trois domaines de force.	74
Figure 27: Modèle d'initiation des oscillations du fuseau mitotique chez <i>C. elegans</i>	76
Figure 28: Mécanisme d'autoentraînement des oscillations.	77
Figure 29: Arbre phylogénétique des espèces Caenorhabditis cultivées en laboratoire.	83
Figure 30: <i>C. elegans</i> et <i>C. briggsae</i> sont morphologiquement identiques.	84
Figure 31: Alignement des séquences de Ce-GPR-1, Ce-GPR-2 et Cbr-GPR-2.	88
Figure 32: <i>Cbr-gpr-2</i> est fonctionnel dans <i>C. elegans</i>	136
Figure 33: Localisation du transgène GFP:: <i>Cbr-GPR-2</i> dans une lignée <i>C. elegans</i>	137
Figure 34 : Le phénotype de <i>Ce + Cbgpr</i> est identique à celui d'une lignée <i>Ce + Cegpr</i>	139
Figure 35: <i>Ce-gpr-2</i> a un effet dominant négatif dans <i>C. briggsae</i>	141
Figure 36 : Localisation du transgène <i>gfp ::Ce-gpr-2</i> en présence et en absence de la protéine Cbr-GPR-2 endogène.	142
Figure 37: Cb-GPR-2 n'est pas suffisant pour induire de l'overcentration.	144
Figure 38: L'effet dominant négatif de Ce-GPR-2 affecte l'overcentration dans <i>C. briggsae</i>	144
Figure 39 : Les protéines GPR et LIN-5 semblent avoir co-évolué dans les deux espèces.	145

Figure 40: Localisation de GFP ::Cbr-GPR-2 dans un contexte <i>lin-5 (RNAi)</i>	146
Figure 41: Cbr-GPR-2 a besoin de la protéine Ce-LIN-5 endogène pour jouer son rôle dans la génération des forces de traction.	146
Figure 42: Quantification de l'expression des transgènes dans chaque lignée.	148
Figure 43 : Schéma des construits réalisés pour exprimer des protéines chimères.	149
Figure 44 : Création des lignées exprimant les protéines chimères	150
Figure 45 : <i>Nter-Cb/Cter-Ce-gpr</i> est fonctionnel dans <i>C. elegans</i>	151
Figure 46 : <i>Nter-Cb/Cter-Ce-gpr</i> n'a pas l'effet dominant négatif de <i>Ce-gpr-2</i> dans <i>C. briggsae</i>	152
Figure 47 : L'overcentration pourrait dépendre de la partie Cter de Cb-GPR-2.	153
Figure 48: Identification d'une lignée "activatrice"	162

Liste des Tableaux

Tableau 1: Homologues des protéines du complexe générateur de forces dans les différents modèles.	24
Tableau 2 : Lignées utilisées pour l'études des mouvements des centrosomes en DIC.	91
Tableau 3 : Lignées transgéniques ou mutantes utilisées dans les différentes études.	91
Tableau 4 : Liste des plasmides utilisés pour l'inactivation des gènes par RNAi.	94
Tableau 5 : Liste des plasmides utilisés pour le double hybride.	96
Tableau 6: Liste des plasmides clonés par Gateway utilisés pour la transgénèse par microinjection.	98
Tableau 7 : Temps d'inactivation utilisés pour les RNAi des différents gènes.	102
Tableau 8 : Microinjection réalisées pour obtenir des lignées exprimant CRY2 ou CIBN.	160
Tableau 9 : Bombardements réalisés pour obtenir des lignées exprimant CRY2 ou CIBN.	160

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Lors de la division cellulaire, l'orientation du fuseau mitotique dicte le plan de clivage de la cellule. Si la cellule possède une polarité intrinsèque, l'alignement du fuseau mitotique par rapport à cet axe de polarité est crucial. Des défauts d'orientation du fuseau mitotique, en entraînant la perte de polarité, peuvent conduire par exemple à la perte d'adhésion des cellules du tissu épithélial, participant ainsi à la tumorigénèse. Au cours du développement, les défauts d'orientation du fuseau mitotique vont conduire à une mauvaise organisation spatiale des cellules. Le complexe moléculaire $G\alpha$ /LGN/NuMA/dynéine est responsable des forces mécaniques permettant la réorientation du fuseau mitotique dans les cellules polarisées. Ce complexe se positionne asymétriquement dans la cellule en réponse à la polarité cellulaire.

L'embryon précoce du nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) a servi de modèle pour décrypter les mécanismes moléculaires, et surtout biophysiques de positionnement du fuseau mitotique. Dans cette cellule, le fuseau mitotique s'oriente le long de l'axe antéro-postérieur de la cellule grâce au complexe $G\alpha$ /GPR/LIN-5 (GPR et LIN-5 étant les homologues fonctionnels de LGN et NuMA, respectivement). Pendant l'anaphase, le fuseau mitotique est tiré vers le pôle postérieur de la cellule également grâce à un enrichissement asymétrique de GPR/LIN-5 au cortex cellulaire postérieur. En conséquence, deux cellules filles de taille et de devenir différents sont générées.

Dans notre équipe nous avons montré que dans l'espèce de nématode *Caenorhabditis briggsae* (*C. briggsae*), la première division embryonnaire est aussi asymétrique et dépend du complexe $G\alpha$ /GPR/LIN-5. Cependant, les mouvements des noyaux et du fuseau mitotique dans l'embryon de *C. briggsae* sont différents de ceux décrits chez *C. elegans*. Ces différences reflètent une différence dans la régulation des forces mécaniques pendant la mitose entre espèce. Nous avons fait l'hypothèse que le complexe $G\alpha$ /GPR/LIN-5 générateur de force pouvait être régulé différemment dans les deux espèces. Nous avons exploité la divergence entre espèces proches dans le but d'identifier des règles communes aux mécanismes de positionnement du fuseau. Nous avons également cherché à comprendre quels changements moléculaires étaient à l'origine de ces différences phénotypiques, pour comprendre comment un système aussi contraint et essentiel que le positionnement du fuseau mitotique pouvait évoluer sur de courts temps évolutif.

Dans ce but, j'ai caractérisé en détail les embryons de l'espèce *C. briggsae* pendant ma thèse. Dans un premier temps, la comparaison des espèces m'a permis de révéler un mécanisme nouveau et conservé, explicatif du démarrage des oscillations du fuseau mitotique en anaphase. Dans un deuxième temps, j'ai pu montrer que la protéine GPR était régulée différemment entre les deux espèces et que ces différences expliquaient en partie les phénotypes observés.

Ces résultats sont expliqués dans des chapitres distincts après une introduction dans laquelle je vais faire tout d'abord un état des lieux des connaissances sur la division asymétrique. Je vais ainsi présenter les connaissances obtenues à partir des modèles drosophiles et Vertébrés dans lesquels de nombreuses approches biochimiques ont mis en avant des régulations au niveau des interactions protéiques du complexe générateur de force. Puis je présenterai le modèle *C. elegans* ainsi que les études et modèles biophysiques établis pour le positionnement du fuseau mitotique. Je terminerai par la présentation de la problématique des approches comparatives et introduirai le modèle *C. briggsae*.

INTRODUCTION

I. La division cellulaire asymétrique et le positionnement du fuseau mitotique

La division cellulaire est un processus fondamental à tout être vivant. Elle est utile à la reproduction d'organismes simples tels que les bactéries mais également au développement et à la régénération d'organismes multicellulaires comme les plantes ou les animaux. En fonction des organismes, les mécanismes de division cellulaire diffèrent. Chez les Procaryotes (et certains Eucaryotes) la division se fait par scissiparité c'est à dire par simple division en deux de l'organisme (Adams and Errington, 2009). Chez la majorité des Eucaryotes la division cellulaire est appelée mitose et implique des changements structurels importants de la cellule.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à une mitose particulière: la division cellulaire asymétrique. Cette division résulte en la formation de deux cellules filles pouvant être de taille et/ou de devenir différents. Elle est essentielle dans les organismes en développement pour la création de tous les tissus. Mais elle est également importante dans les organismes adultes pour le maintien de l'homéostasie.

La plupart des divisions cellulaires asymétriques nécessitent la mise en place préalable d'une polarité. Celle-ci peut être extrinsèque et apportée par l'environnement de la cellule et/ou elle peut être intrinsèque et un axe de polarité est défini au sein même de la cellule. Dans le cas d'une polarité intrinsèque, l'axe de polarité peut être établi par la répartition asymétrique de protéines très conservées au cours de l'évolution qui sont les protéines PARs (PARTitioning defective, voir § II.B). Quelle que soit la signalisation adoptée, du fait de cette polarité le plan de clivage de la cellule va alors être déterminant pour le devenir des cellules filles. Si le plan de clivage est positionné parallèlement à l'axe de polarité il en résulte deux cellules filles identiques comme dans le cas de la division planaire des cellules épithéliales (Figure 1A). En revanche, si le plan de clivage est perpendiculaire à l'axe de polarité, après clivage, les cellules filles ne récupèrent pas les mêmes marqueurs et elles sont donc différentes comme lors de la division des cellules souches (Figure 1B). L'asymétrie peut donc être due à une répartition différente des déterminants cellulaires. Mais elle peut aussi se retrouver au niveau de la taille des cellules filles si le plan de clivage ne se fait pas exactement au centre. L'asymétrie de taille et de déterminants pouvant même être combinées (Figure 1C).

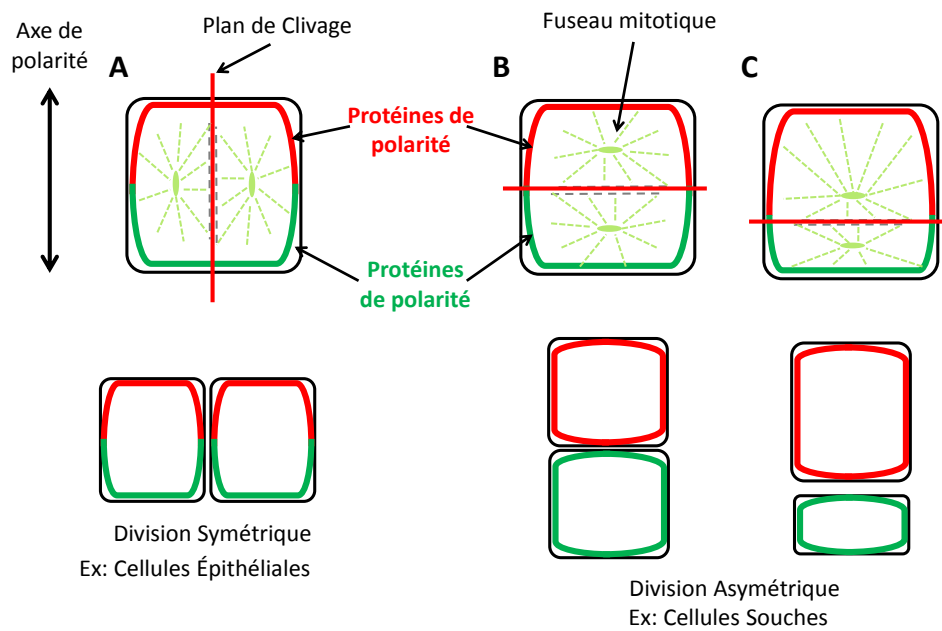


Figure 1: Positionnement du plan de clivage d'une cellule par rapport à un axe de polarité.

A- Si le plan de clivage est positionné parallèlement à l'axe de polarité il en résulte deux cellules filles identiques.
 B- Si le plan de clivage est perpendiculaire à l'axe de polarité, les cellules filles ne récupèrent pas les mêmes marqueurs et elles sont donc différentes.

C- L'asymétrie peut concerner la taille des cellules filles si le plan de clivage n'est pas positionné exactement au centre de la cellule.

La polarité est établie par la répartition asymétrique de domaines protéiques distincts (domaines rouge et vert)

Replacé dans le contexte d'un tissu, on peut comprendre comment le positionnement du plan de clivage va intervenir dans le positionnement des cellules les unes par rapport aux autres.

Si le clivage de la cellule se fait perpendiculairement au plan du tissu, les deux cellules filles restent au sein du tissu (Figure 2A). En revanche si le clivage se fait parallèlement au plan du tissu, l'une des deux cellules filles se retrouvera à l'extérieur du tissu. La cellule exclue pourra éventuellement établir de nouveaux contacts cellule/cellule, différents de ceux créés au sein du tissu et ainsi acquérir de nouvelles propriétés (Figure 2B). L'orientation de la division est donc primordiale pour la morphogénèse des tissus ou lors des processus de différenciation cellulaire.

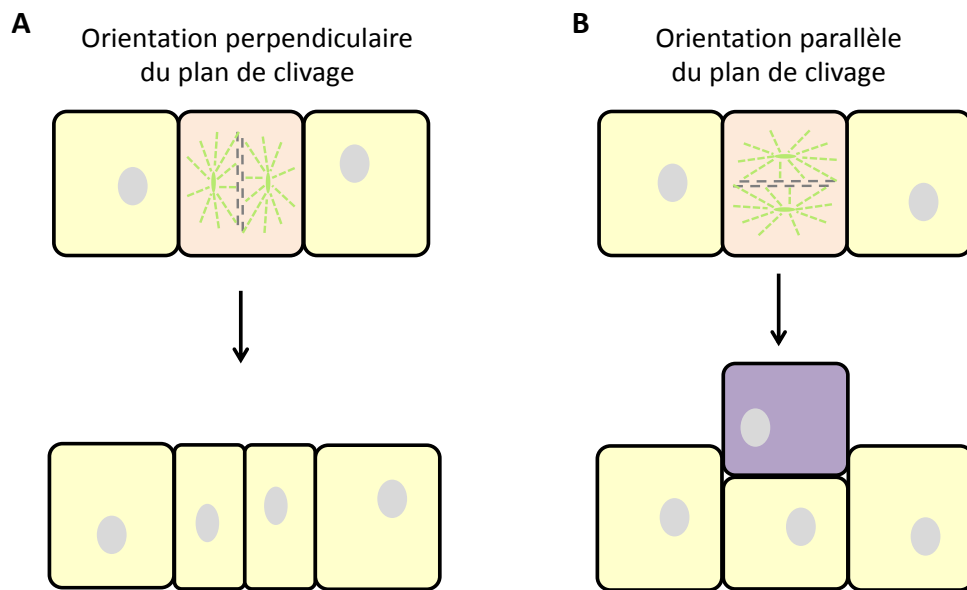


Figure 2: Conséquences de l'orientation du plan de clivage d'une cellule en division au sein d'un tissu.

A- Si le clivage de la cellule se fait perpendiculairement au plan du tissu, les deux cellules filles restent au sein du tissu, les deux cellules filles vont alors garder les mêmes caractéristiques que la cellule mère.

B- Si le clivage se fait parallèlement au plan du tissu, l'une des deux cellules-filles se retrouvera à l'extérieur du tissu. La cellule exclue (en violet) va acquérir de nouvelles propriétés et se différencier.

La structure cellulaire qui dicte le plan de clivage est le fuseau mitotique car lors de la cytokinèse il est coupé perpendiculairement en son milieu. Le fuseau mitotique prend en charge le matériel génétique pour assurer une ségrégation correcte des chromosomes entre chacune des cellules filles. Cette structure est composée de deux centres organisateurs des microtubules (MTOC), appelés également « centrosomes », qui vont constituer les pôles du fuseau. Les microtubules vont être nucléés à partir de ces centrosomes. Les microtubules sont des polymères polarisés composés d' α et β -tubuline. L'extrémité "-" des microtubules est stabilisée au niveau des centrosomes. En revanche, la polymérisation étant plus importante que la dépolymérisation à l'extrémité "+", les microtubules vont croître et se dépolymériser en permanence au niveau de cette extrémité. Plusieurs types de microtubules vont être nucléés :

- les microtubules interpolaire qui sont les microtubules provenant de chacun des pôles et qui sont dirigés vers le pôle opposé. Ces microtubules s'entrecroisent et forment alors des

réseaux de microtubules antiparallèles qui sont stabilisés par des protéines associées aux microtubules. Ils participent à la rigidité de cette structure.

- les microtubules astraux qui croissent en direction de la membrane plasmique et qui, nous le verrons dans le paragraphe suivant, participent au positionnement du fuseau mitotique.

- les microtubules kinétochoriens qui sont reliés aux kinétochores (structures protéiques situées au niveau des centromères des chromosomes) et permettent l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale (Figure 3).



Figure 3: Schéma du fuseau.

Les chromosomes sont représentés en rouge et bleu et se situent au centre du fuseau mitotique. Les centrosomes constituant les pôles du fuseau mitotique vont polymériser les différents types de microtubules.

Les microtubules interpolaire provenant de chacun des pôles et qui sont dirigés vers le pôle opposé sont représentés en blanc.

Les microtubules astraux en vert polymérisent en direction de la membrane plasmique.

Les microtubules kinétochoriens en jaune sont rattachés aux kinétochores des chromosomes.

(Extrait de biology-forums.com)

Le fuseau est donc très dynamique car il est constitué de microtubules qui polymérisent et dépolymérisent continuellement ainsi que de protéines associées qui les stabilisent et permettent d'en faire une structure plus rigide. Une fois que le fuseau s'est positionné et que la séparation des chromosomes a eu lieu, le fuseau est coupé grâce à la formation d'un anneau contractile d'actine au centre de celui-ci (Mierzwa and Gerlich, 2014). Ainsi, il est primordial que le fuseau soit bien orienté car sa position par rapport à

l'axe de polarité fixe la taille et le déterminisme des cellules filles. Comprendre la division cellulaire asymétrique revient donc à comprendre le mécanisme de positionnement du fuseau mitotique.

La division asymétrique et le positionnement du fuseau sont impliqués dans de nombreuses pathologies renforçant l'importance d'étudier ces mécanismes.

Comme citées en exemple, les cellules souches représentent un exemple typique de division asymétrique. Ces cellules sont essentielles lors du développement d'un organisme et cette stratégie de division leur est indispensable pour simultanément maintenir le pool de cellules souches et former les cellules différenciées. On retrouve ces cellules pour le développement du système nerveux central ou pour la formation de toutes les cellules sanguines par exemple. Il est donc très important que ces cellules se divisent correctement que ce soit dans un tissu en développement ou lors du maintien de l'homéostasie d'un tissu adulte. En effet des défauts d'orientation de ces divisions pourraient avoir des conséquences dramatiques sur un organisme. Par exemple, il apparaît depuis quelques années que certains cancers proviennent de cellules souches ayant perdu leur identité. Suite à une mauvaise répartition des déterminants cellulaires, ces cellules perdent leur capacité de différenciation mais conservent celle d'autorenouvellement entraînant alors une surprolifération initiant le développement de tumeurs. Cette mauvaise répartition des déterminants cellulaires est due à un défaut de polarité et/ou à un mauvais positionnement du fuseau mitotique (Pease and Tirnauer, 2011).

La dérégulation de la division de cellules autres que des cellules souches peut aussi conduire à un processus de tumorigénèse. Dans les cellules mammifères, affecter des protéines telles que la protéine APC (Adenomatous polyposis coli) ou la protéine VHL (Von Hippel Lindau) peut initier l'apparition de tumeur. Les gènes de ces protéines sont connus comme étant des suppresseurs de tumeur et des études montrent que la mutation de ces protéines peut compromettre l'orientation du fuseau. Bien que cela soit encore controversé pour APC, ces protéines participent à la stabilisation des microtubules expliquant que la perte de la fonctionnalité de ces protéines conduisent à des problèmes au niveau du fuseau et de son orientation (Noatynska et al., 2012). Les instabilités chromosomiques ainsi que la surprolifération des cellules qui découlent des problèmes de polarité et de positionnement

du fuseau sont responsables de l'apparition de cancer (Baum and Georgiou, 2011; Dekanty et al., 2012).

La surprolifération des cellules n'est pas la seule conséquence d'un défaut de division asymétrique. Une mauvaise orientation du fuseau peut au contraire être à l'origine de la réduction d'un « pool » de cellule initial. On retrouve ce défaut dans plusieurs maladies neuronales telles que la microcéphalie, la lissencéphalie ou même encore la maladie de Huntington (Lancaster and Knoblich, 2012; Noatynska et al., 2012). La microcéphalie est une anomalie de la croissance de la boîte crânienne, le diamètre de la tête étant inférieur à la normale, alors que la lissencéphalie est une anomalie de l'apparence du cortex cérébral qui consiste en la réduction, complète ou non, des sillons traversant le cortex donnant un aspect plus "lisse" au cortex. Ces maladies apparaissent suite à la mutation de gènes codant pour des protéines impliquées dans la biogénèse des centrioles (*mcph-6 (primary microcephaly type 6)/sas-4 (spindle assembly abnormal protein 4)*), la maturation des centrosomes (*mcph-5 (primary microcephaly type 5)/aspm-1 (abnormal spindle-like microcephaly-associated protein 1)*) ou encore la stabilisation des microtubules (*lis-1 (lissencephaly-1)*, *nde-1 (nudE neurodevelopment protein 1)*) (Lancaster and Knoblich, 2012; Noatynska et al., 2012). Tous ces gènes participent à l'intégrité du fuseau et à son bon fonctionnement. La mutation de *mcph-5/aspm-1* est une des plus courantes dans ce type de maladie. Lors du développement du cortex chez la souris, les cellules souches neuroépithéliales perdent leur capacité à orienter leur fuseau parallèlement à la surface ventriculaire du neuroépithélium lors de la phase proliférative. Il y a donc une augmentation du nombre de divisions obliques différenciatives qui diminuent le nombre de précurseurs neuronaux (Figure 4). Chez le nématode *C. elegans*, ASPM-1 est importante pour la rotation du fuseau méiotique car elle recrute deux protéines indispensables dont un moteur moléculaire (van der Voet et al., 2009). Bien qu'il n'y ait aucune évidence en mitose, par homologie, il se peut que chez la souris MCPH-5 contrôle l'orientation du fuseau en recrutant également un moteur (Lancaster and Knoblich, 2012; Noatynska et al., 2012).

Chez la souris, la mutation de *lis-1* (sous-unité du moteur moléculaire dynéine) conduit à une orientation aléatoire du fuseau mitotique du fait d'une déstabilisation des microtubules astraux à proximité du cortex (Moon et al., 2014; Noatynska et al., 2012). Enfin la huntingtine (HTT), qui est la protéine mutée dans la maladie dégénérative de Huntington,

perd son interaction avec la dynéine et les microtubules conduisant à une augmentation du nombre de divisions obliques c'est à dire une augmentation de la différenciation des précurseurs neuronaux au détriment de l'autorenouvellement (Lancaster and Knoblich, 2012; Noatynska et al., 2012).

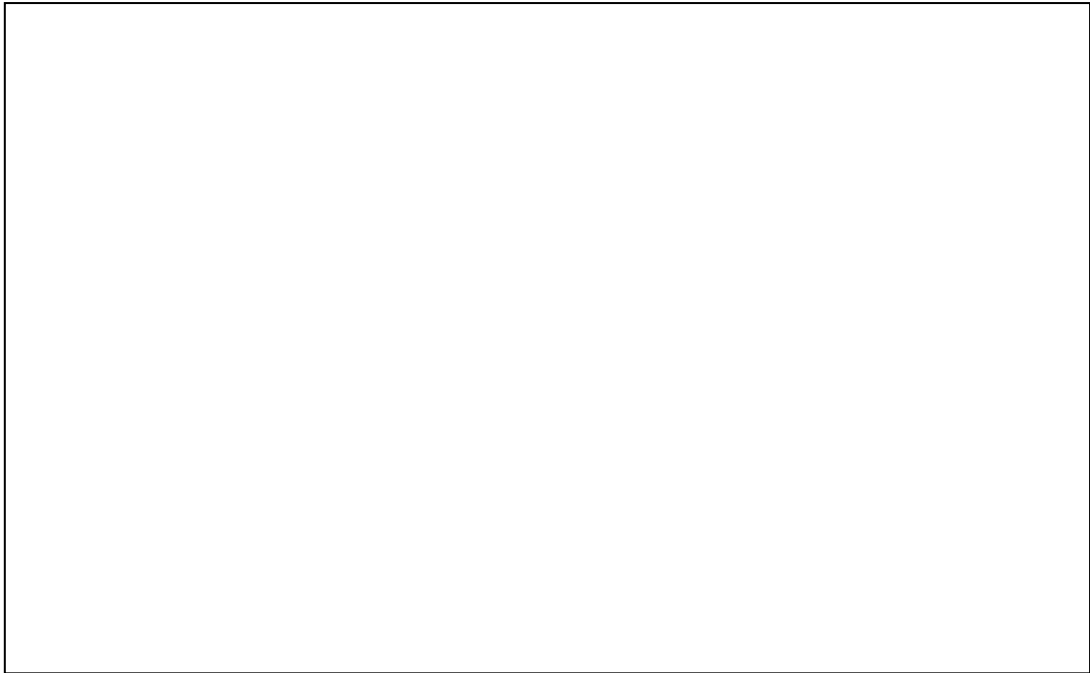


Figure 4: Phase proliférative et phase neurogénique des cellules souches neurales lors du développement du système nerveux.

Au début du développement les progéniteurs neuraux se divisent lors d'une phase dite « proliférative » par l'intermédiaire d'une division symétrique verticale qui permet l'augmentation du nombre de précurseurs (Cellules violette sur le schéma).

Plus tard dans le développement les cellules vont se diviser lors d'une phase dite « neurogénique » par l'intermédiaire d'une division asymétrique oblique qui permet la formation d'une cellule différenciée: le neurone et d'une cellule gliale radiale (RG) qui va pouvoir se diviser de nouveau (Cellules vertes sur le schéma).

NEP: neuroepithelial progenitor; RG : Radial Glial cell; VZ: ventricular zone; SVZ: subventricular zone; CP: cortical plate.

(Extrait de Chavali et al., 2014).

La division asymétrique est donc un processus qu'il est important de comprendre. Mais l'étude de ce mécanisme dans les cellules souches est compliquée. Dans la plupart des cas, les cellules souches sont localisées dans des niches cellulaires. Ces niches sont spécifiques du tissu dont elles font partie par la fonction assurée par ce tissu. Il y a, par exemple, des niches spécifiques des cellules souches hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse, ou encore des cellules souches de l'épiderme ou des cellules souches du

système nerveux. La signalisation induite par une niche cellulaire pour les régulations des cellules souches fait intervenir de nombreuses variables. Celles-ci peuvent être des interactions ligands/récepteurs ou encore des signaux biochimiques comme des cytokines ou encore des changements de la force ionique... Il est donc difficile d'intégrer tous ces signaux dans la polarisation et le positionnement du fuseau mitotique d'une cellule.

De nombreux modèles ont été utilisés pour l'étude de la division asymétrique, de lignées cellulaires à l'étude *in vivo* dans des tissus complexes. L'identification de modèles de cellules ayant une polarité intrinsèque a grandement facilité l'étude de cette division. C'est le cas par exemple du neuroblaste (NB) de drosophile. Cette cellule est issue d'un tissu polarisé, le neuroépithélium. C'est une cellule souche pluripotente qui va effectuer un nombre limité de division pour produire les cellules neurales. Il a été montré lors de la division asymétrique du NB que la dérégulation des protéines de positionnement du fuseau mitotique entraîne la prolifération des cellules (Knoblich, 2010; Wodarz and Näthke, 2007). Un autre modèle largement utilisé est l'embryon de *C. elegans*. Dans cet organisme la division de la première cellule du zygote est asymétrique. Bien que n'étant pas une cellule souche à proprement parler, le fuseau mitotique se réoriente en fonction de la polarité et se positionne asymétriquement dans la cellule. Il en résulte alors deux cellules filles qui sont différentes en taille et qui ont déjà un devenir différent. L'avantage de ces organismes est la possibilité de combiner des études de biologie cellulaire avec des études génétiques. Ceci a permis de rapides avancées dans la compréhension moléculaire des mécanismes de polarisation et de positionnement du fuseau.

La polarité et le positionnement du fuseau sont donc des éléments clé du bon déroulement de la division asymétrique. Au cours de ma thèse je me suis plus particulièrement intéressée aux mécanismes de positionnement du fuseau mitotique en réponse à la polarité cellulaire, et nous allons voir à présent comment fonctionne ce mécanisme.

I.A. Mécanisme général du positionnement du fuseau mitotique

Le mécanisme de positionnement du fuseau mitotique fait intervenir de nombreuses protéines. Ici je vais présenter une vue d'ensemble de ce mécanisme en mettant en avant les

principales molécules qui interviennent dans ce processus et que l'on retrouvera quel que soit l'organisme étudié.

Bien que l'établissement de la polarité fût très étudié depuis les années 1980, la compréhension de la transduction du signal de polarité en mécanisme de positionnement se fit plus tard. Vers la fin des années 1990, il a été montré que le positionnement des noyaux et du fuseau faisaient intervenir les microtubules astraux qui entrent en contact avec le cortex (Adames and Cooper, 2000). Aussi, même si son rôle était initialement controversé (Cottingham and Hoyt, 1997), la dynéine, qui est un moteur moléculaire dirigé vers l'extrémité "-" des microtubules et qui est important pour le trafic vésiculaire, est aussi primordiale pour les processus de positionnement des structures contenant le matériel génétique. Toutefois, aussi bien les microtubules que la dynéine sont requis pour la plupart des événements cellulaires et il était encore peu connu comment ces molécules pouvaient générer des mouvements orientés dans une direction spécifique en réponse à une polarité.

Ceci n'a été résolu qu'à partir des années 2000 avec l'implication des protéines G hétérotrimériques dans des défauts d'orientation du fuseau. Elles comprennent trois sous-unités : alpha, beta, et gamma. Lorsqu'elle est associée au GDP, la sous-unité $G\alpha$ forme un hétérotrimère avec les sous-unités $G\beta\gamma$, le complexe étant alors inactif. Cependant une fois que $G\alpha$ échange son GDP en GTP, elle se dissocie de $G\beta\gamma$ et les sous-unités peuvent alors jouer leur rôle sur leurs propres effecteurs. Cette réaction est réversible, $G\beta\gamma$ pouvant de nouveau être associées à $G\alpha$ lorsqu'elle retourne sous sa forme liant le GDP. Ces protéines sont capables de transduire des signaux provenant de récepteurs membranaires afin d'activer de multiples effecteurs cellulaires. Cependant dans le cas du mécanisme de positionnement du fuseau, la signalisation est récepteur-indépendant et les protéines intervenant dans le mécanisme interagissent directement avec $G\alpha$. De plus alors que dans le cas des récepteurs couplés aux protéines G la sous-unité active est $G\alpha::GTP$, lors du positionnement nous verrons qu'il s'agit de la forme $G\alpha::GDP$. La sous-unité $G\alpha$ est myristoylée et est donc localisée à la membrane (Mumby et al., 1990; Song et al., 1996). $G\alpha$ va en fait localiser la dynéine au cortex via deux molécules adaptatrices. Une première molécule contenant un domaine GoLoco interagissant directement avec $G\alpha$ et une deuxième protéine contenant un domaine super-enroulé interagissant directement avec la dynéine

(Figure 5). La dynéine va alors être indirectement ancrée au cortex par ce complexe et grâce à l'activité motrice de la dynéine il va en résulter une traction des microtubules astraux.

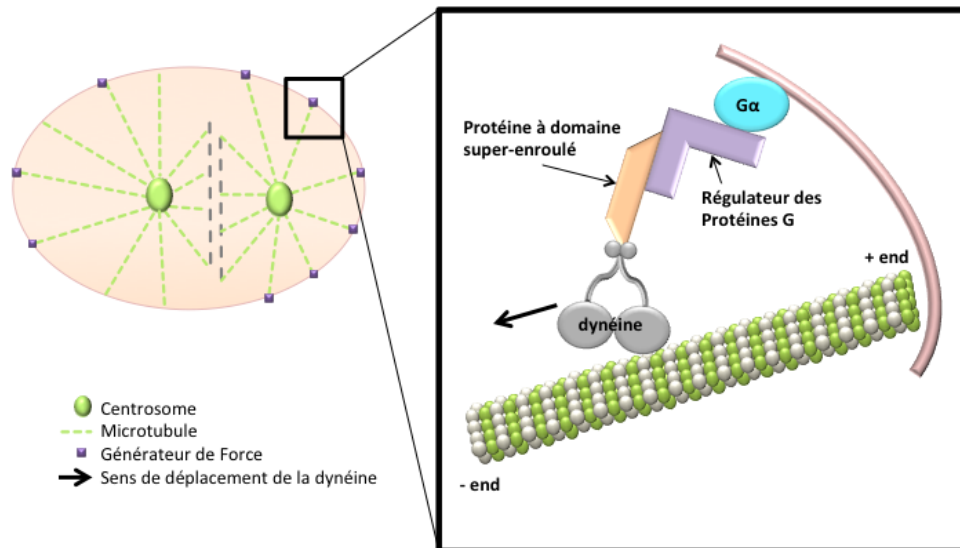


Figure 5: Un complexe protéique cortical permet d'interagir avec les microtubules pour positionner le fuseau mitotique.

La dynéine indirectement ancrée au cortex par un complexe protéique va tracter les microtubules astraux grâce à son activité motrice dirigée vers l'extrémité négative des microtubules.

Ce mécanisme de positionnement est très conservé au cours de l'évolution et toutes ces protéines ont été tour à tour identifiées dans différents modèles comme la levure, le nématode, la drosophile ou encore dans des modèles très variés de vertébrés (lignées cellulaires, souris, poulet ...) (Tableau 1). Bien que la conservation de ce complexe soit indéniable, chaque modèle présente des spécificités quant à la régulation de ce complexe ou même l'activité des protéines. Nous allons voir à présent plus en détail comment ce complexe a été identifié et comment il fonctionne chez la drosophile ainsi que dans des modèles vertébrés. Dans un autre chapitre nous verrons spécifiquement l'étude de ce complexe chez *C. elegans* qui est le modèle que j'ai étudié au cours de ma thèse.

Tableau 1: Homologues des protéines du complexe générateur de forces dans les différents modèles.

Modèle	Protéines Galpha	Régulateur des Protéines G (domaine GoLoco)	Protéine super- enroulée
<i>C. elegans</i>	GOA-1 ; GPA-16	GPR-1 ; GPR-2	LIN-5
<i>D. melanogaster</i>	Gai, Gao	Pins	Mud
Vertébrés	Gai, Gao	AGS-3 ; LGN	NuMA

I.B. La division asymétrique chez la drosophile

Drosophila melanogaster (*D. melanogaster*) est un organisme largement employé pour l'étude du positionnement du fuseau mitotique lors de la division asymétrique. Les études de différents types cellulaires au sein même de la drosophile ont permis de mettre en évidence deux voies distinctes mais pouvant être complémentaires pour le positionnement du fuseau dans certains cas.

I.B.1. Mise en évidence de la voie Gai/Pins/Mud

Lors de la mise en place du système nerveux central, les NBs, qui sont des cellules souches neurales, délaminent du neuroectoderme qui est un épithélium polarisé. Leur division est asymétrique selon un axe apico-basal pour générer une grande cellule apicale, le NB, et une petite cellule basale, le "ganglion mother cell" (GMC) (Figure 6). Le GMC va lui-même se diviser de nouveau et donner deux progéniteurs neuronaux. La polarisation dans un tissu est complexe. L'établissement et le maintien des domaines corticaux, apicaux et basaux, requièrent l'intervention d'autres domaines tels que les jonctions serrées ou les jonctions d'adhérence afin d'éviter la diffusion des molécules corticales. Suite à la délamination, les signaux de polarité du NB sont principalement intrinsèques. Mais un signal extrinsèque provenant de l'épithélium est quand même nécessaire pour que les divisions successives du neuroblaste s'effectuent toujours avec la même orientation, c'est-à-dire avec le domaine apical du côté de la zone de contact avec l'épithélium (Siegrist and Doe, 2006). La polarité du NB est mise en place par la localisation du côté apical du complexe Bazooka (Baz, PAR-3), protéine à domaine PDZ, DmPAR-6 et la protéine kinase atypique DaPKC. En réponse à cette polarité, les déterminants cellulaires Miranda (Mir), Numb et Prospéro (Pros),

protéine à homéodomaine se localisent au cortex basal. Ces protéines vont alors ségréger dans la future cellule basale, Pros permettant la différenciation de cette cellule en promouvant l'expression des gènes spécifiques du GMC et réprimant ceux spécifiques du NB (Figure 6).

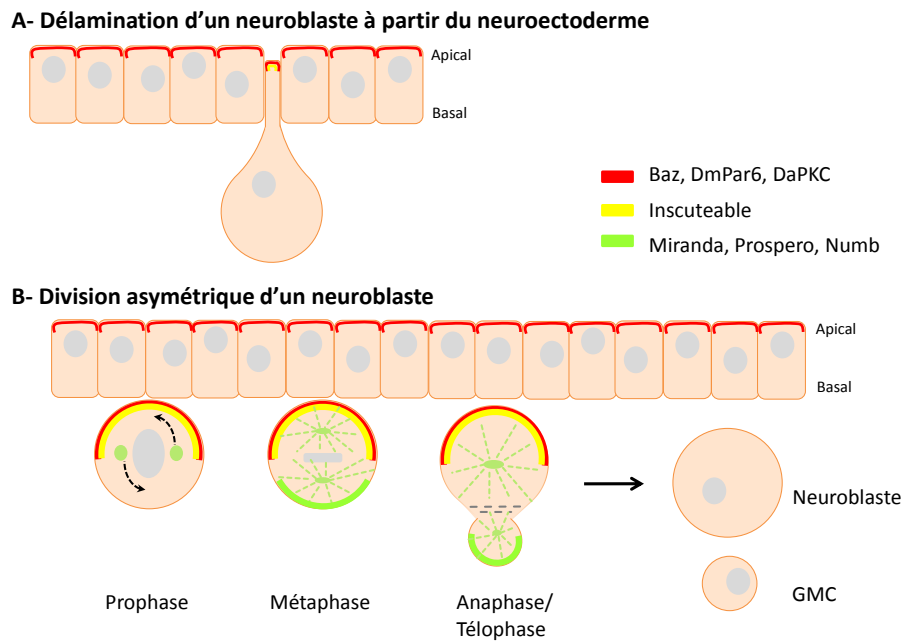


Figure 6: Positionnement du fuseau mitotique dans un neuroblaste (NB) de drosophile.

La division du NB est asymétrique selon un axe apico-basale. Cette division génère une grande cellule apicale, le NB, et une petite cellule basale, le "ganglion mother cell" (GMC).

A- Le NB délamine à partir du neuroectoderme.

B- Une polarité apico-basale se met en place par la formation de domaines corticaux distincts. Insc est localisé au niveau du cortex apical alors que les déterminants cellulaires Miranda, Numb et Prospero vont se localiser au cortex basal et vont ségréger dans le GMC.

En réponse à la polarité, le fuseau mitotique se positionne perpendiculairement au plan du tissu, le plan de clivage sera alors parallèle.

Cependant, si le fuseau est mal orienté et qu'il se positionne parallèlement à l'axe de l'épithélium et donc perpendiculairement à l'axe apico-basal, la répartition des déterminants sera symétrique. La différenciation des GMCs ne peut plus se faire et il en résulte une prolifération des NBs (Figure 7).

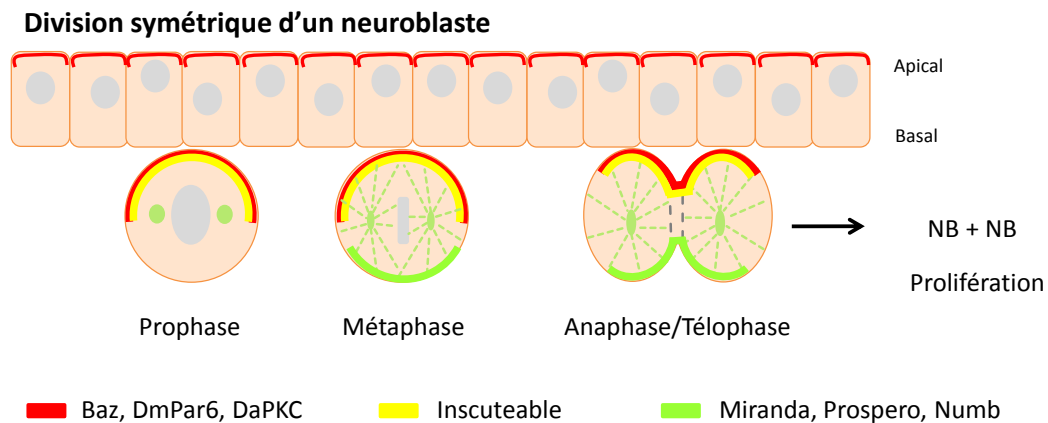


Figure 7: Conséquences d'un défaut d'orientation du fuseau mitotique lors de la division du Neuroblaste (NB).

Si le fuseau mitotique est mal orienté et que le plan de clivage de la cellule est perpendiculaire au plan de l'épithélium, les déterminants cellulaires vont être répartis dans les deux cellules. Il en résultera la formation de deux NBs qui vont proliférer.

L'importance du contrôle de l'orientation du fuseau dans le déterminisme des cellules fait du NB de drosophile un outil essentiel à l'étude de la coordination de la polarité avec le positionnement du fuseau et la répartition des déterminants cellulaires. La caractérisation de différents mutants pour l'orientation du fuseau conduisant à une surprolifération des NBs a permis l'identification de nombreux partenaires protéiques se localisant de manière spécifique autour du cortex. Les premières protéines identifiées comme indispensables pour l'orientation du fuseau sont Inscuteable (Insc), Partner of Inscuteable (Pins) et la protéine hétérotrimérique Gαi. L'inactivation de ces protéines conduit à des défauts d'orientation du fuseau mitotique par rapport à l'axe de polarité ainsi qu'à une mauvaise localisation des déterminants cellulaires (tels que Pros ou Numb) (Izumi et al., 2004; Schaefer et al., 2000; Tio et al., 1999; Yu et al., 2000).

Très tôt dans le cycle cellulaire, dès l'interphase (pendant la délamination), Insc est localisée au pôle apical de la cellule, suite à son recrutement par Baz (Wodarz et al., 1999). Cette localisation apicale est maintenue au cours de la division par l'interaction conjointe de Baz, Pins et Insc, la déplétion de chacune de ces protéines entraînant la perte de localisation des deux autres (Yu et al., 2000). Il apparaît donc que, dans le NB, la polarité et le positionnement du fuseau sont physiquement couplés par cette interaction Baz/Insc/Pins.

Des cribles double hybride ainsi que des « pull-down assay » ont mis en évidence l'interaction de la partie N-terminale (Nter) de Pins avec Insc (Yu et al., 2000). Cette région comporte sept répétitions du motif Tétratricopeptide (TPR) qui est un motif d'interaction protéine-protéine. Mais seules les répétitions 1 à 4 sont indispensables pour cette interaction (Siller et al., 2006). De plus, la partie C-terminale (Cter) de Pins, qui contient trois domaines GoLoco, interagit avec la sous-unité Gαi des protéines hétérotrimériques G (Parmentier et al., 2000). Plus particulièrement avec Gαi liant le GDP (Schaefer et al., 2000) (Figure 8).

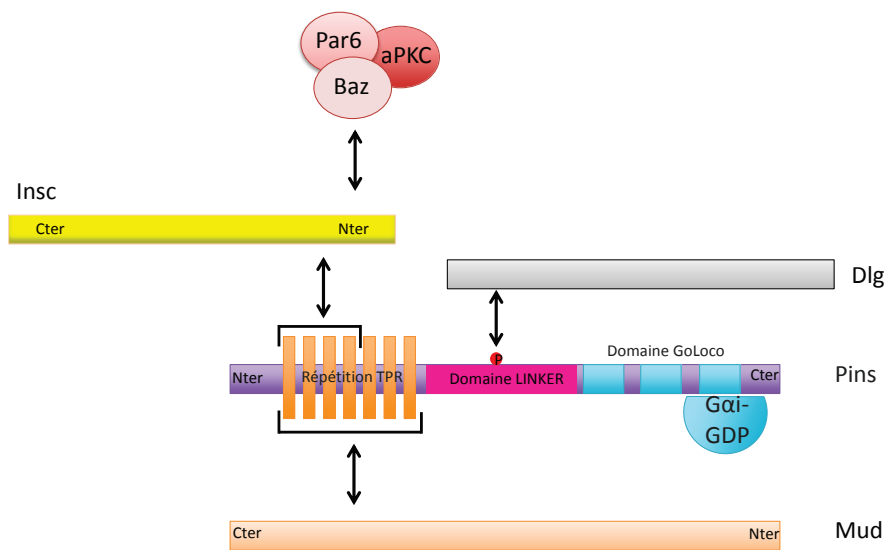


Figure 8: Interactions des protéines intervenant dans le positionnement du fuseau du neuroblaste de drosophile.

Insc et Pins forment un complexe avec Baz.

La partie Nter de Insc peut interagir avec les répétitions 1 à 4 du motif TPR situées dans la partie Nter de Pins.

La partie Cter de Pins possède 3 domaines GoLoco et peut interagir avec Gαi liant le GDP.

La partie Cter de Mud interagit avec les 7 répétitions TPR de la partie Nter de Pins.

Le domaine LINKER de Pins, situé entre les répétitions TPR et les domaines GoLoco, va interagir avec Dlg une fois phosphorylé par Aurora A.

Insc et Pins sont nécessaires à la localisation asymétrique apicale de Gαi. En prophase, dans un mutant *insc*, Gαi est localisée tout autour du cortex tout comme dans un mutant *pins* (Schaefer et al., 2000). Mais dans un mutant *insc*, malgré l'interdépendance des protéines pour leur localisation, un croissant cortical de Pins et Gαi peut se reformer dès la métaphase. Cependant, du fait de la perte du maintien de la polarité dans ces mutants (Baz ne pouvant plus se localiser), la position du croissant Pins/Gαi est aléatoire. Cette reformation du domaine Pins/Gαi implique qu'en fonction de la position du domaine

reformé, si elle est plutôt apicale cela ne conduira pas à un défaut d'orientation du fuseau mitotique (Figure 9). En effet dans ces mutants le taux de divisions symétriques est assez faible, les NBs subissant alors un phénomène de "*telophase rescue*".

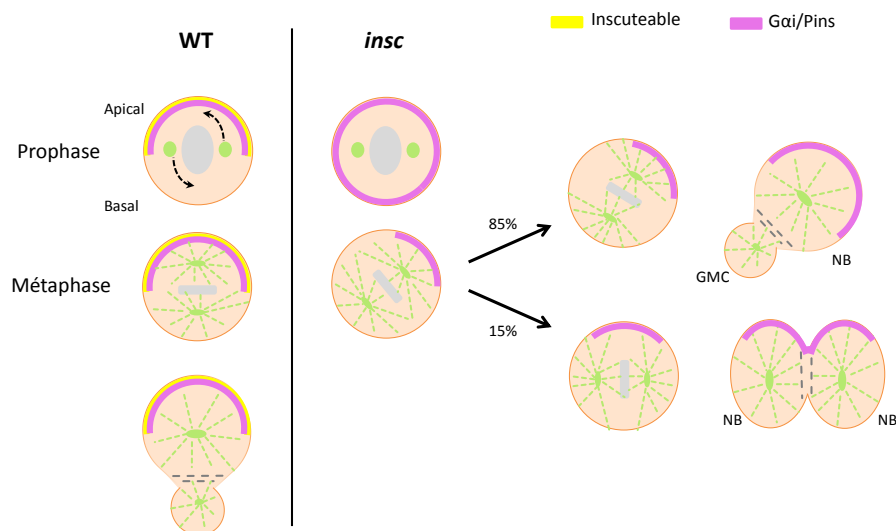


Figure 9: Phénotype de *Telophase Rescue* dans des neuroblastes (NB) de drosophile.

En métaphase, un croissant cortical de Pins/Gai va se reformer aléatoirement dans des mutants *insc*. En fonction de la localisation de ce croissant la division du NB sera soit symétrique, soit asymétrique. Le mécanisme impliqué dans la reformation de ce croissant Pins/Gai réduit donc fortement le nombre de divisions symétriques et donc de NBs présentant des défauts.

On pourrait penser que ce phénomène se produit grâce à la tentative de localisation de Pins. Cependant, bien que le taux de divisions symétriques chez les mutants *pins* soit plus élevé que dans les mutant *insc* (28% ; Parmentier et al., 2000), il n'est pas de 100% ce qui semble indiquer que ces mutants bénéficient également du phénomène de *telophase rescue*. Ce mécanisme est encore mal connu. Il semble permettre le réalignement du fuseau par rapport aux domaines qui ont réussi à s'établir, ou le réarrangement des protéines corticales par rapport au fuseau. Il permet alors de limiter le nombre de cellules ayant un phénotype anormal (division symétrique dans le cas de *insc* et *pins*). Le fuseau n'effectuant que peu de mouvements entre la prophase et l'anaphase, Siller *et al.*, soutiennent la deuxième hypothèse (Siller et al., 2006).

I.B.2. Mud fait le lien entre domaine cortical et positionnement du fuseau

Il est clair que la localisation des domaines corticaux ainsi que l'orientation du fuseau mitotique sont liées. Mais d'un point de vue mécanistique, comment le fuseau est-il engagé dans la bonne direction ? Ceci est possible grâce à une protéine capable de lier Pins et de

faire le lien entre polarité et orientation du fuseau. Il s'agit de la protéine Mushroom body defect (Mud), l'homologue de NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus protein) chez les Vertébrés. C'est une protéine à domaine super-enroulé et qui possède également un domaine de liaison aux microtubules en Cter. Elle est enrichie aux centrosomes et possède la même localisation apicale que Pins. Elle est requise pour l'alignement du fuseau par rapport à la polarité en métaphase (Bowman et al., 2006; Izumi et al., 2006; Siller et al., 2006). Gai et Pins sont indispensables pour la localisation de Mud au cortex mais ce n'est pas réciproque. Ainsi Mud se positionne au cortex en aval de Pins/Gai et la polarité n'est pas affectée dans les mutants *mud*. Cependant ces mutants présentent de forts défauts d'orientation. Ces défauts sont dus à un mauvais positionnement du fuseau par rapport à la polarité en prophase et très peu de mouvements du fuseau jusqu'en télophase, suggérant un rôle crucial de Mud dans le positionnement du fuseau (Izumi et al., 2006; Siller et al., 2006). Pins recrute Mud au cortex apical via une interaction moléculaire directe faisant intervenir les répétitions 1 à 7 du domaine TPR de Pins et le domaine Cter de Mud (Figure 9). Des tests de sédimentation et de formation des microtubules *in vitro* ont montré que Mud pouvait interagir avec les microtubules (Bowman et al., 2006). Cette interaction, corrélée avec le fait que le fuseau s'oriente en direction du domaine cortical où le complexe Mud/Pins réside, semble indiquer que le positionnement se fait grâce à l'action de Mud (Bowman et al., 2006; Izumi et al., 2006; Siller et al., 2006). Cependant, NuMA, l'homologue de Mud chez les Vertébrés, est connu pour interagir avec le moteur moléculaire dynéine (Voir § I.C.1). L'interaction physique Mud/dynéine est moins claire. Il a été montré que Mud pouvait interagir avec la sous-unité de la chaîne légère de la dynéine Cut up (Ctp) (Wang et al., 2011). De plus, l'orientation du fuseau est affectée lors de l'inactivation de *lis-1* ou *dlc-1* (*dynein light chain 1*) ou *ctp* qui sont des composants de la dynéine (Johnston et al., 2009; Wang et al., 2011). Ces résultats suggèrent donc que l'activité motrice de la dynéine est requise pour le positionnement du fuseau et que la dynéine pourrait être recrutée dans le complexe via une interaction avec Mud.

I.B.3. Mise en évidence du complexe Pins/Dlg/Khc-73

Il existe un mécanisme indépendant du complexe Insc/Baz qui permet de localiser Pins au cortex, expliquant la formation tardive du croissant Pins/Gai. Dans les NBs ce deuxième mécanisme n'est révélé qu'en absence de *insc* et il implique la protéine Disc large

(Dlg). La découverte de cette deuxième voie s'est faite lors de l'étude de la division asymétrique des cellules précurseuses de l'organe sensoriel ou cellules SOP (Bellaïche et al., 2001). On retrouve ces cellules au sein du notum qui constitue la partie dorsale du thorax de la drosophile. Il est constitué d'un épithélium de polarité apico-basale mais ce tissu possède également une polarité antéro-postérieure.

Les cellules SOP pI se divisent asymétriquement selon l'axe antéro-postérieur résultant en deux cellules filles: pIIa au postérieur et pIIb à l'antérieur. Cette division antéro-postérieure au sein d'un épithélium de polarité apico-basale est appelée division planaire (Figure 10). La polarité planaire nécessite un remodelage de la polarité apico-basale. Tout d'abord Baz, DmPAR6 et DaPKC vont se relocaliser au domaine postérieur alors que Pins sera à l'antérieur. L'interaction Dlg/Pins dans les cellules SOP contrôle la localisation antérieure de Pins et indirectement la bonne localisation de Baz (par la bonne localisation de Pins) (Bellaïche et al., 2001). Ainsi, ces protéines se retrouvent dans des domaines opposés alors qu'elles colocalisaient dans le NB. Dans ce cas de figure, Baz n'est pas requis pour localiser Pins à l'antérieur à l'inverse du NB. Par contre, Gai colocalise toujours avec Pins et le rôle de Pins pour le positionnement du fuseau est aussi couplé à celui de la polarité, Pins affectant toujours la localisation de Baz (Figure 10). L'une des différences majeures des cellules SOP avec les NBs est l'absence d'expression de *insc*. À cause de la redondance du mécanisme de Insc avec le mécanisme de Dlg pour la localisation de Pins, ce n'est qu'en 2005 que le rôle de Dlg a pu être mis en évidence dans les NBs par l'équipe de Chris Doe dans un contexte *insc* mutant.

Division asymétrique d'une cellule SOP

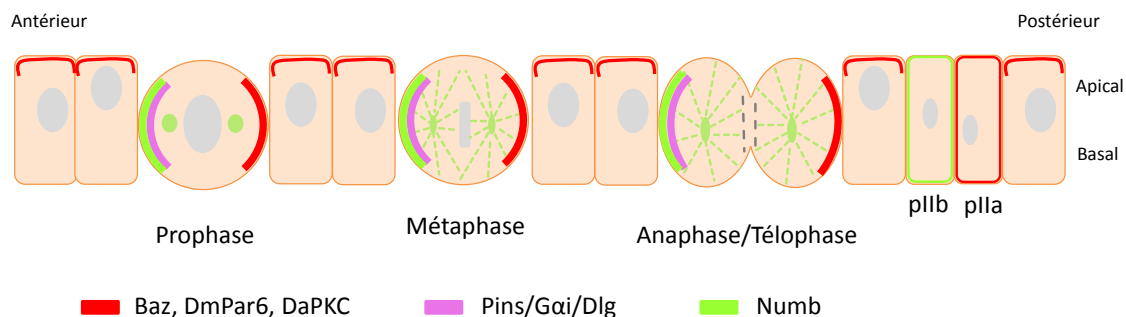


Figure 10: Positionnement du fuseau mitotique dans des cellules SOP de drosophile.

Les cellules SOP pI se divisent asymétriquement selon l'axe antéro-postérieur résultant en deux cellules filles: pIIa au postérieur et pIIb à l'antérieur. Dans ces cellules *insc* n'est pas exprimé. Baz, DmPAR6 et DaPKC vont se relocaliser au domaine postérieur alors que Dlg, Pins et Gai vont se retrouver au cortex antérieur et colocaliser avec Numb.

Dlg est un homologue de la "membrane associated guanylated kinase" (MAGUK) et par conséquent possède un domaine kinase guanylé (GK). Cette protéine étant connue chez les mammifères pour s'associer à des protéines associées aux microtubules, il a été supposé qu'elle permettrait de faire le lien entre la mise en place de la polarité et le croissant de Pins avec le positionnement du fuseau mitotique. Une seule protéine pouvant lier à la fois les microtubules et un domaine GK a été identifiée par homologie entre des protéines mammifères et de drosophile : la chaîne lourde de la kinésine 73 (Khc-73). Khc-73 se localise à l'extrémité "+" des microtubules et coimmunoprécipite avec Dlg (Siegrist and Doe, 2005). Cependant que ce soit dans les cellules SOP ou dans les NBs, aucune évidence n'a révélé la présence des trois protéines dans un même complexe Khc-73/Dlg/Pins. Seules les interactions Khc-73/Dlg et Dlg/Pins ont été décrites. Or, comme pour le double mutant *insc/dlg*, ou un mutant *insc* dans lequel les microtubules astraux seraient dépolymérisés, dans le double mutant *insc/khc-73*, Pins est incapable de se localiser au cortex. Ceci suggère que l'interaction Khc-73/Dlg est importante pour l'induction de la polarité corticale via Khc-73 et les microtubules (Siegrist and Doe, 2005). Enfin, si chaque simple mutant *insc* ou *dlg* bénéficie du mécanisme de *telophase rescue*, le double mutant *insc/dlg* en est incapable. Ceci montre la redondance des deux voies dans le positionnement de Pins en vue d'une orientation correcte du fuseau même si leur activation est différée au cours de la mitose, la première agissant dès la prophase et la seconde dès la métaphase (Siegrist and Doe, 2005).

Ainsi les deux mécanismes semblent complémentaires dans le NB. La voie Gai/Pins/Mud/dynéine serait le véritable effecteur du positionnement du fuseau grâce à la dynéine et son activité motrice dirigée vers l'extrémité "-" des microtubules. Alors que la voie Pins/Dlg/Khc-73 agirait pour la stabilisation du fuseau. Khc-73, localisée à l'extrémité "+", va interagir avec Dlg ce qui va ensuite créer des connexions supplémentaire entre les microtubules et Pins localisée au cortex. On connaît encore mal le rôle exact de Khc-73 dans le positionnement du fuseau, d'autant plus que son sens de déplacement sur les microtubules s'oppose à celui de la dynéine. Mais une étude récente a révélé une interaction entre les deux voies via ces moteurs. Khc-73 et la dynéine sont connectées via deux adaptateurs expliquant comment les deux voies fonctionnent en synergie dans le positionnement du fuseau. Deux protéines à domaine 14-3-3 vont lier Khc-73 au niveau de son domaine « stalk » à condition qu'il soit phosphorylé. L'hétérodimère de protéine 14-3-3

va également interagir avec NudE qui est un adaptateur de la dynéine et qui active ce moteur. Il apparaît donc que les deux voies fonctionnent ensemble afin que la dynéine soit activée spécifiquement au niveau du cortex apical pour que le positionnement du fuseau se fasse correctement (Lu and Prehoda, 2013) (Figure 11).

En ce qui concerne les cellules SOP, la voie Pins/Dlg/Khc-73 est responsable du positionnement du fuseau le long de l'axe antéro-postérieur. Mais comme ces cellules n'expriment pas *insc*, la voie Gai/Pins/Mud/dynéine n'est pas activée comme dans les NBs. En revanche Mud et la dynéine ont quand même été identifiées dans une troisième voie initiée par Frizzled (Fz) et Disheveled (Dsh) (Ségalen et al., 2010). La manière dont les microtubules sont utilisés par ces complexes est encore mal comprise. Cependant il semble que les voies Fz/Dsh/Mud/dynéine et Pins/Dlg/Khc-73 soient complémentaires dans les cellules SOP. La première permettant le maintien de l'orientation planaire et la deuxième de l'orientation antéro-postérieure (Figure 11).

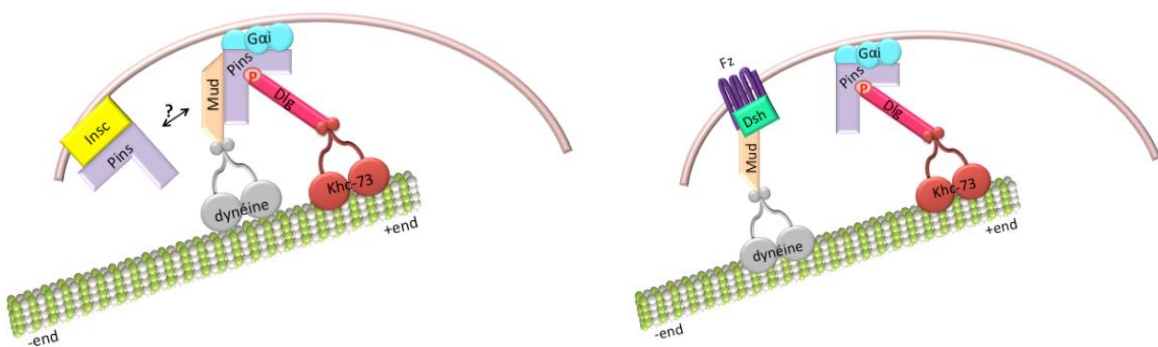


Figure 11: Bilan des mécanismes de positionnement du fuseau chez la drosophile.

Lors de la division apico-basale (à gauche) : La voie Gai/Pins/Mud/dynéine serait le véritable effecteur du positionnement du fuseau grâce à la dynéine et son activité motrice dirigée vers l'extrémité "-" des microtubules. Alors que la voie Pins/Dlg/Khc-73 agirait pour la stabilisation du fuseau.

Lors de division planaire (à droite): La voie Pins/Dlg/Khc-73 est responsable du positionnement du fuseau le long de l'axe antéro-postérieur. Mais comme ces cellules n'expriment pas *insc*, la voie Gai/Pins/Mud/dynéine n'est pas activée contrairement aux NBs. Mais il existe une voie Fz/Dsh/Mud/dynéine La première permettant le maintien de l'orientation planaire et la deuxième de l'orientation antéro-postérieure.

I.B.4. Régulation des voies de positionnement du fuseau mitotique

Il est important que l'interaction de Pins et Mud soit finement régulée afin de la restreindre au cortex apical et ainsi déterminer l'orientation du fuseau. Cette régulation se fait dans un premier temps par une compétition entre l'interaction intramoléculaire des domaines TPR et GoLoco de Pins et la liaison de Gai et Mud. Cette interaction intramoléculaire maintient la protéine dans une conformation « fermée ». Gai va lier un des trois sites GoLoco recrutant ainsi Pins au cortex mais ceci n'est pas suffisant pour ouvrir la protéine. L'interaction entre le domaine TPR et Mud ne peut se faire qu'en coopération avec la liaison des deux autres sites GoLoco par Gai (Nipper et al., 2007) (Figure 12). Un mécanisme similaire a été identifié quelques années auparavant pour l'homologue humain de Pins : hLGN (voir § II.C.1).

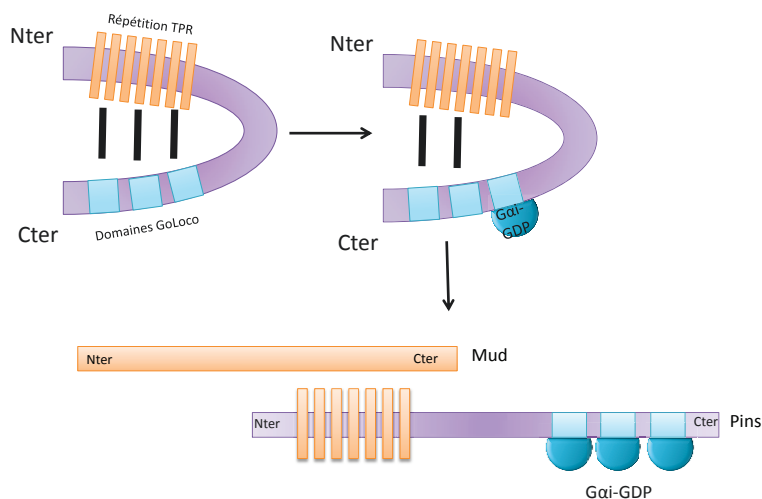


Figure 12 : Pins possède une interaction intramoléculaire via ses domaines TPR et GoLoco.

Les domaines GoLoco en Cter et les domaines TPR en Nter peuvent interagir. Pins est alors en conformation "fermée". L'interaction de Gai avec le premier domaine GoLoco fragilise l'interaction moléculaire mais n'est pas suffisant pour "ouvrir" la protéine.

Seule l'interaction conjointe de Mud et de deux autres Gai vont permettre d'ouvrir Pins entièrement.

Le deuxième niveau de régulation fait intervenir Insc. Des immunoprécipitations montrent que Insc et Mud lient exclusivement Pins. En effet, malgré le fait que Insc et Mud coimmunoprécipitent toutes les deux avec Pins, ces trois protéines ne sont pas partenaires d'un même complexe. Lorsque l'on immunoprécipite Insc on retrouve bien Pins mais jamais Mud et inversement, lorsque l'on immunoprécipite Mud, on retrouve Pins mais jamais Insc. Ainsi, lors de l'immunoprécipitation de Pins, il y a en fait un pool de protéines qui interagit avec Insc et un autre qui interagit avec Mud (Mauser and Prehoda, 2012). Il y a donc une compétition entre ces deux protéines. Cette compétition a été plus particulièrement mise en

évidence par l'analyse cristallographique de Pins et Insc et de leurs homologues chez les Vertébrés (voir § II.C.1).

En revanche, malgré la compétition Insc/Mud, Insc et Dlg peuvent lier Pins en même temps (Mauser and Prehoda, 2012). Ceci est possible car Dlg interagit avec un autre domaine de Pins situé entre ses domaines TPR et GoLoco, appelé "Linker" (Figure 8). Cependant, le recrutement de Dlg ne se fait que si ce domaine Linker est phosphorylé par la kinase Aurora A (Johnston et al., 2009). Ainsi, lorsque Insc est liée à Pins, la voie Dlg/Khc-73/MT est préférentiellement activée empêchant la voie Gai/Pins/Mud d'intervenir.

Malgré la découverte de ces régulations, certaines interrogations demeurent toujours comme par exemple comment Pins est-elle transférée de Insc à Gai ? Ou encore, du fait de l'interaction intramoléculaire de Pins et sachant que Mud a besoin de l'intervention de Gai pour l'ouverture de Pins, comment Insc lie-t-elle Pins ? Existe-t-il un mécanisme similaire d'ouverture de Pins par Gai pour que Insc puisse se lier ? Aussi, quel est le rôle de la voie Dlg lorsque Pins est liée à Insc ? Favorise-t-elle la liaison de Mud via son interaction Khc-73/dynéine ?

I.B.5. Conclusion sur l'étude de la division asymétrique chez la drosophile

Il apparaît grâce à l'étude de la drosophile qu'au sein du même organisme, plusieurs mécanismes interviennent pour le positionnement du fuseau. Des expériences *in vitro* novatrices ont permis une caractérisation plus précise de chacune des voies. Ces expériences se firent grâce à l'induction d'une polarité dans des cellules S2 qui, à la base, ne sont pas polarisées. Les protéines d'intérêt normalement localisées asymétriquement dans les NBs ou les cellules SOP sont fusionnées à une protéine particulière : Echinoid (Ed). Cette protéine est spécifique des contacts cellule/cellule et s'enrichit au niveau de la jonction de contact. Ainsi le contact de deux cellules S2 va induire l'enrichissement de la protéine d'intérêt voire même du domaine protéique d'intérêt. Ceci est suffisant pour orienter le fuseau par rapport à la zone d'enrichissement (Johnston et al., 2009) (Figure 13). Cette technique a permis d'étudier le rôle de chacun des partenaires dans chacune de ces voies. C'est cette technique qui a identifié le rôle du domaine Linker de Pins dans la voie Dlg ou encore l'interaction de Khc-73 avec la dynéine via deux adaptateurs (Johnston et al., 2009; Lu and Prehoda, 2013). Cette technique a également été utilisée pour tester l'implication de Mud et de la dynéine dans la voie Fz/Dsh/Mud/dynéine (Ségalen et al., 2010). Les expériences de FRET, de mesure

d'anisotropie de fluorescence et de biochimie (GST pulldown assay, immunoprécipitation, purification...) ont révélé une régulation fine de Pins due à des interactions intramoléculaires (Mauser and Prehoda, 2012; Nipper et al., 2007; Smith and Prehoda, 2011).



Figure 13: Système Echinoid dans des cellules S2 de drosophile.

Image confocale de cellules S2 exprimant la protéine aPKC fusionnée à la GFP et à la protéine Echinoid (Ed). aPKC va alors s'enrichir au niveau de la zone de contact des deux cellules. Cet enrichissement va induire une polarité qui exclut Miranda (Mira) de la zone de contact.
(Photo extraite de Johnston *et al.*, 2009).

Enfin cet organisme a révélé le mécanisme de *telophase rescue*. Ce mécanisme est encore mal connu et intervient dans les mutants *pins* et les mutants *insc*. Il pourrait aussi intervenir dans les mutants *mud* bien que les résultats soient très controversés. Siller *et al.* pensent que le faible taux de division symétrique (5%) dans les mutant *mud* suggère que cette protéine n'est pas essentielle pour ce mécanisme (Siller et al., 2006). Ceci est renforcé par l'étude de Bowman *et al.* qui montre que dans les mutants *mud*, il y a une quantité importante de *telophase rescue*, et que la surprolifération des NBs est due à la mauvaise ségrégation des déterminants cellulaires tel que Mir. Cette mauvaise ségrégation est le résultat du mauvais positionnement du fuseau mitotique dans seulement 4% des NBs. Cependant, malgré ce faible taux, des cellules qui auraient dû être des GMC se transforment en NBs ectopiques suffisants pour conduire à cette prolifération (Bowman et al., 2006). En revanche une autre équipe affirme que le mécanisme de *telophase rescue* n'a pas lieu dans les mutants *mud* (Izumi et al., 2006). Enfin, suite à la découverte de la voie Dlg dans le positionnement du fuseau, on pouvait penser que le phénomène de *telophase rescue* passait par cette voie dans un mutant *insc* et inversement pour un mutant *dlg*. De plus, il n'y a pas de *telophase rescue* dans un double mutant *insc ; dlg* (Siegrist and Doe, 2005). Cependant, sachant que Pins intervient dans les deux voies (de même que Mud), et qu'il semble que les mutants *pins* bénéficient quand même de ce mécanisme (alors que pour les mutants *mud* cela est plus controversé), il se pourrait qu'un autre mécanisme indépendant des deux précédents interviennent, impliquant encore de nouvelles protéines.

En conclusion, la drosophile a permis l'identification de nombreux partenaires du complexe responsable du positionnement du fuseau mais également une compréhension plus poussée de la régulation de Pins et des deux voies dans lesquelles cette protéine joue un rôle.

I.C. Positionnement du fuseau mitotique dans des cellules de Vertébrés

L'orientation du fuseau mitotique a également été très étudiée dans de nombreux autres modèles tels que des lignées cellulaires, humaines ou animales, ainsi que des tissus plus complexes issus de la souris, du rat, du poulet, du poisson zèbre et même du furet! Ceci rend compliqué la reconstitution d'un modèle unique au vu de la diversité des modèles étudiés. Les lignées cellulaires les plus utilisées pour décrypter les protéines impliquées sont les COS7 qui sont des cellules dérivant de reins de singe et qui ont les caractéristiques de fibroblastes. Elles sont principalement utilisées pour l'expression de protéines recombinantes et pour réaliser des expériences de biochimie telles que des immunoprécipitations. Une seconde lignée cellulaire est très utilisée : la lignée des cellules MDCK qui dérivent de reins de chien. Ces cellules ont la particularité de s'organiser en kystes lorsqu'elles sont cultivées en Matrigel, avec leur pôle apical faisant face au lumen et leur domaine basal en contact avec le milieu extérieur. Grâce à cette organisation, ces cellules permettent d'étudier les effets de protéines d'intérêt sur la polarité ainsi que sur l'orientation du fuseau (Figure 14).

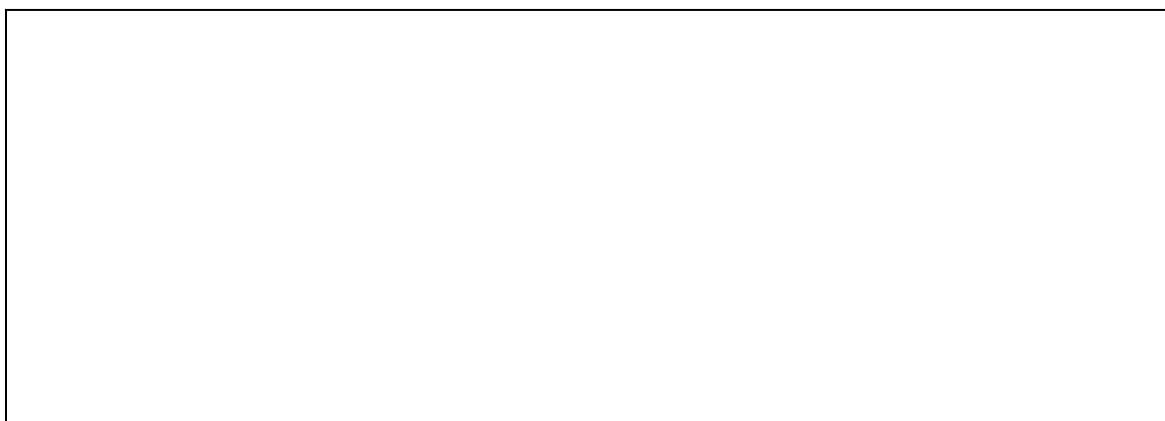


Figure 14: Les cellules MDCK s'organisent en kystes lorsqu'elles sont cultivées en Matrigel.

Images confocales de plusieurs sections en z de cellules MDCK organisées en kyste avec l'actine (en rouge) marquant le domaine apical côté lumen et la beta-catenin (en vert) marquant les membranes latérales. Dans ce système, malgré la perte de Par3, une polarité est maintenue et les cellules s'organisent quand même en kyste mais elles possèdent plusieurs lumina.
(Photos extraite de Hao *et al.*, 2010)

I.C.1. Identification du complexe G α /LGN/NuMA

Les premières protéines identifiées grâce à leur homologie avec la protéine de drosophile Pins, sont hLGN et hAGS-3 (h pour humain ; Leu-Gly-Asn repeat-enriched ; Activators of G protein Signaling). LGN a majoritairement été étudiée car sa similarité de séquence avec Pins est plus importante (48%) et son expression est ubiquitaire. Alors que l'expression d'AGS-3 (46% d'identité) est tissu-spécifique (Du et al., 2001). Elle est constituée de 7 domaines TPR en Nter, comme Pins, et de 4 domaines GoLoco alors que Pins en a 3 (Du et al., 2001). Il a été montré qu'aussi bien la surexpression que l'inhibition de *lgn* conduisent à des défauts de stabilité du fuseau mitotique par la désorganisation des pôles ainsi que des problèmes de ségrégation des chromosomes générant des micronoyaux (Du et al., 2001). Ces phénotypes sont retrouvés lors de l'inactivation de NuMA (protéine homologue de Mud chez la drosophile) (Gordon et al., 2001). L'une des fonctions essentielle de NuMA est l'attachement des microtubules aux pôles du fuseau. Cette protéine fonctionne de manière redondante avec les protéines des centrosomes lors de l'assemblage initial de ceux-ci. Mais sa fonction d'attachement des microtubules est primordiale pour la maintenance de la stabilité du fuseau (Radulescu and Cleveland, 2010). Les défauts observés sont donc cohérents avec le fait que la partie Nter de LGN interagit de façon directe avec la partie Cter de NuMA et montrent que, comme l'interaction Pins/Mud chez la drosophile, celle de LGN/NuMA doit être finement régulée (Du et al., 2001, 2002) (Figure 15).

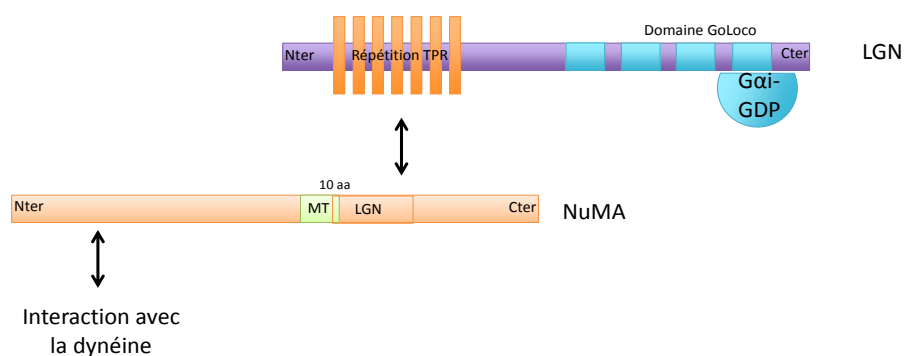


Figure 15: Interaction des protéines intervenant dans le positionnement du fuseau chez les vertébrés.

La partie Cter de NuMA interagit avec la partie Nter de LGN.

La partie Cter de LGN possède 4 domaines GoLoco et peut interagir avec G α liant le GDP.

Le domaine de liaison et de stabilisation des microtubules de NuMA se situe en Cter et chevauche de 10 acides aminés celui permettant l'interaction avec LGN.

La partie Nter (1-705) de NuMA interagit avec la dynéine.

Il a été montré que lors de la mitose, LGN contrôle la localisation de NuMA. Cette dernière est localisée dans le noyau en interphase ou elle ne peut se lier à LGN. En revanche elle est libérée dans le cytoplasme dès la rupture de l'enveloppe nucléaire et va se localiser aux pôles du fuseau ainsi qu'au cortex (Radulescu and Cleveland, 2010). La surexpression de LGN en mitose entraîne une mauvaise localisation de NuMA, expliquant les phénotypes observés d'instabilité du fuseau mitotique et de mauvaise ségrégation du matériel génétique (Du et al., 2001). En retour, l'association avec NuMA est indispensable pour que LGN soit recrutée au cortex (Du and Macara, 2004). Cependant, du fait de l'importance de ces protéines pour le maintien du fuseau mitotique, les inactivations de *lgn* ou NuMA conduisent à des défauts précoces qui masquent les effets de la perte de fonction de ces protéines sur le positionnement du fuseau mitotique. Toutefois, c'est grâce à l'analyse de hLGN et NuMA que l'interaction intramoléculaire de LGN a été mise en évidence pour la première fois par une expérience de FRET (alors qu'elle n'est révélée qu'en 2007 chez la drosophile). Cette interaction intramoléculaire maintient donc la protéine dans un état fermé. Cette inhibition intramoléculaire est levée par l'intervention de G α i ou NuMA (Du and Macara, 2004). LGN peut lier simultanément NuMA et G α i et plus spécifiquement le G α i liant le GDP comme Pins chez la drosophile. La conformation fermée de LGN a une faible affinité pour NuMA ou G α i:GDP. Ainsi, la dynamique de localisation de NuMA est intéressante. En interphase elle est restreinte au noyau alors que LGN est cytoplasmique. Leur interaction est donc impossible. Mais après la rupture de l'enveloppe nucléaire NuMA peut lier LGN et changer sa conformation. LGN va ensuite lier G α i:GDP et être recrutée au cortex (Du and Macara, 2004). Mais contrairement à la drosophile, il ne semble pas que la liaison G α i soit indispensable à la liaison de NuMA. Il a plutôt été montré qu'aussi bien G α i que NuMA pouvaient se lier à LGN en premier mais que l'ouverture de la protéine reste incomplète et que seule la liaison des deux protéines permettait l'ouverture complète de LGN. Ainsi LGN pourrait d'abord se localiser au cortex via G α i puis d'une manière cycle-dépendante, lorsque le positionnement du fuseau est requis, NuMA serait libérée pour compléter le complexe.

Enfin, le domaine de liaison et de stabilisation des microtubules de NuMA se situe en Cter et chevauche de 10 acides aminés celui permettant l'interaction avec LGN. Aussi, NuMA ne peut pas lier LGN et les microtubules en même temps. Il a été montré que LGN inhibe la fonction stabilisatrice des microtubules de NuMA en bloquant son site de liaison aux

microtubules (Figure 15) (Du et al., 2002). Ceci suggère que lorsque NuMA est en complexe avec LGN, l'interaction avec les microtubules se fait par un autre intermédiaire. Depuis longtemps les rôles de NuMA et de la dynéine dans l'assemblage et le maintien des pôles du fuseau sont étroitement liés (Merdes et al., 2000). Mais l'identification d'une interaction NuMA/dynéine s'est faite récemment. La difficulté d'identifier une telle interaction vient du fait que la dynéine est un gros complexe composé de plusieurs sous-unités. Il a quand même été montré que la *Dyneine Intermediate Chain* (DIC) coimmunoprécipite avec NuMA. Par la suite, il a été montré que la partie Nter (1-705) de NuMA interagit avec la dynéine et ce domaine est suffisant pour recruter la dynéine au cortex (Kotak et al., 2012). Ainsi, Gai, LGN, NuMA et dynéine interagissent donc pour former un complexe.

Mais malgré la conservation de ce complexe, son implication dans le positionnement du fuseau n'est pas aussi claire que pour le NB de drosophile. L'identification des homologues de LGN dans d'autres organismes a, par la suite, permis de confirmer la conservation de la fonctionnalité des protéines dans le positionnement du fuseau. Ainsi en 2003, Yu et ses collaborateurs identifient l'homologue murin de LGN. mLGN (m pour mouse) partage 49% de similarité avec Pins et 92% avec hLGN. Tout comme hLGN, son domaine Nter est composé de 7 TPR et son domaine Cter de 4 GoLoco. Des tests *in vitro* ont montré que mLGN peut interagir avec dInsc (d pour drosophile) et ce via son domaine Nter (notamment les TPR 3-7) comme Pins. L'expression ectopique de mLGN dans des NBs de drosophile montre que la protéine se localise au cortex apical. La protéine peut même se substituer à Pins dans des NBs déplétés pour *pins*. Elle va localiser dInsc au cortex apical et permettre la ségrégation des déterminants tels que Mir ou Numb (Yu et al., 2003). Ainsi, malgré une conservation faible au niveau protéique, mInsc est capable de remplacer dInsc en ce qui concerne la localisation des domaines et des déterminants ainsi que pour le positionnement du fuseau le long de l'axe apico-basal dans le NB. Chez la drosophile, pour la différenciation du GMC4-2a en neurones RP2 et RP2sib, un défaut de *pins* fait que RP2sib adopte le devenir de RP2. Ceci conduit à une duplication des neurones RP2 dans 60% du tissu. L'expression ectopique de mLGN réduit fortement cette duplication et seul 6% du tissu présentent une duplication de RP2. Ceci suggère que la conservation de la fonctionnalité est forte mais que des divergences demeurent (Yu et al., 2003).

L'identification des orthologues Vertébrés de Insc s'est faite un peu plus tard du fait de sa faible conservation. Insc a été identifiée *in silico* chez l'homme en 2003 mais aussi dans d'autres organismes comme la souris ou le poulet. Insc peut interagir avec LGN. De plus Insc, LGN et Gai, coimmunoprécipitent (Zigman et al., 2005). Pendant plusieurs années on pensait que Insc était la protéine clé qui faisait le lien entre polarité et positionnement du fuseau. Cependant les complexes Par3/Insc/LGN et Gai/LGN/NuMA ont des rôles séquentiels dans les divisions cellulaires orientées. Les structures cristallographiques de LGN (et Pins), hInsc (et dInsc) et NuMA ont révélé que les interactions LGN/NuMA et LGN/hInsc sont mutuellement exclusives et LGN ne peut donc lier en même temps NuMA et hInsc (Culurgioni et al., 2011; Zhu et al., 2011). Les 7 TPR de LGN ou Pins forment une niche concave. Les domaines Cter de hInsc ou dInsc adoptent une conformation qui concorde avec cette niche. De plus, dans la séquence de Insc, certains acides aminés indispensables pour l'interaction avec LGN ou Pins sont conservés : W31 et E40P41E42 pour hInsc que l'on retrouve dans dInsc W313 E322P323E324 (Culurgioni et al., 2011). L'analyse de NuMA montre que sa conformation correspond également à la niche formée par LGN. Les interactions LGN/hInsc et LGN/NuMA ne peuvent être simultanées et sont spécifiques de par leur séquence en acides aminés. Insc interagit surtout via des liaisons hydrophobes alors que NuMA interagit surtout via des liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques (Culurgioni et al., 2011; Zhu et al., 2011). L'analyse cristallographique de Mud n'a pas été réalisée mais il est probable que l'on retrouve des interactions similaires à celles de NuMA et LGN. De plus l'exclusivité des interactions dInsc/Pins et Pins/Mud a été montrée en immunoprécipitation (Mauser and Prehoda, 2012). Un signal doit donc favoriser l'interaction d'une protéine puis de l'autre avec LGN. Ce signal pourrait être contrôlé par l'orientation du fuseau en fonction de l'avancement du cycle cellulaire. Il serait important d'identifier si ces interactions exclusives sont régulées temporellement ou si elles se produisent au même moment mais en proportions différentes. Cette exclusivité permet peut être de choisir entre stabilité et déplacement du fuseau.

I.C.2. Un complexe, deux orientations

Le même complexe protéique Gai/LGN/NuMA est également impliqué pour l'orientation du fuseau lors de la division planaire chez les Vertébrés. Le positionnement se fait en deux étapes. Le fuseau se place d'abord dans l'axe planaire de la cellule en métaphase

puis maintient ce positionnement au cours de l'anaphase (Peyre et al., 2011). Dans ce cas là, le complexe est localisé en ceinture corticale latérale et ce par un mécanisme encore mal connu. Dans les cellules MDCK, LGN est exclu du domaine apical. Cette restriction se fait par la phosphorylation de la Ser401 de LGN par aPKC. Cette sérine est conservée entre les homologues mammifères et insectes. Elle correspond à la Ser436 de Pins dans le domaine Linker qui est phosphorylé par Aurora A lors de l'activation de la voie Dlg. LGN phosphorylée va alors recruter une protéine à domaine 14-3-3 ce qui empêche sa liaison avec Gαi et la décroche du cortex apical (Hao et al., 2010). Ainsi un défaut de aPKC, ou même de Par3 qui rompt l'association de aPKC avec le cortex, entraîne une délocalisation de LGN. Par3 et aPKC assurent donc la bonne orientation du fuseau en excluant LGN du cortex apical. Toutefois, dans le neuroépithélium de poulet, la restriction latérale de LGN est indépendante de aPKC. En revanche, elle est dépendante de Gαi qui est répartie uniformément autour du cortex. Une augmentation du niveau protéique de Gαi ou l'expression d'un mutant de Gαi liant constitutivement le GDP perturbe la localisation de LGN qui sera alors répartie uniformément (Peyre et al., 2011). Depuis peu il a également été montré que Dlg était important pour les progéniteurs du neuroépithélium de poulet. Dlg1 est essentielle au recrutement cortical de LGN et en l'absence de Dlg1, le fuseau se positionne aléatoirement (Saadaoui et al., 2014). Ces résultats indiquent un rôle conservé de Dlg dans l'orientation de la division planaire en contrôlant la localisation de LGN.

Les études dans les cellules MDCK semblaient indiquer que contrairement à la division apicobasale où la localisation du complexe se fait par recrutement des protéines, dans le cas de la division planaire la localisation semblait se faire par défaut en une ceinture latérale du fait de l'exclusion de LGN du pôle apical. En revanche une étude a montré que dans le neuroépithélium de poulet, le complexe était recruté par Dlg1. Il semble donc il y avoir plusieurs mécanismes pour la localisation du complexe pour la division planaire chez les vertébrés. La localisation en ceinture corticale latérale de LGN/NuMA est essentielle pour l'orientation planaire du fuseau, et l'une des protéines intervenant probablement dans le choix du positionnement du fuseau est Insc. Sa régulation est encore mal comprise mais son expression et sa localisation apicale favorisent la division apicobasale.

I.C.3. Conclusion sur le positionnement du fuseau chez les Vertébrés

Les découvertes des protéines chez les Vertébrés ont été facilitées par l'identification des protéines chez la drosophile. Mais l'étude cristallographique de Insc, NuMA et LGN mettant en avant l'exclusivité des interactions Insc/LGN et NuMA/LGN a remis en question la formation du complexe Insc/Pins/Mud chez la drosophile. D'après les expériences d'immunoprécipitation chez la drosophile, il avait été proposé que les trois protéines forment un complexe mais les interactions avaient été montrées deux à deux. Suite aux résultats des expériences de cristallographie, les interactions des protéines ont été de nouveau testées. Il s'est avéré que les protéines Insc, Pins et Mud ne coimmunoprécipitaient jamais ensemble. Enfin, comme pour les cellules SOP, il semble que plusieurs mécanismes puissent fonctionner en parallèle lors de la division planaire chez les Vertébrés. Toutefois l'implication d'un deuxième mécanisme n'a pas été démontrée lors des divisions apico-basales. Il se peut que, comme chez la drosophile, la voie G α i/LGN/NuMA/dynéine prédomine masquant le deuxième mécanisme.

I.D. Conclusion

La composition du complexe responsable du positionnement du fuseau mitotique a très bien été explorée dans ces modèles drosophile et vertébrés et beaucoup des expériences décrites pour identifier les différents interacteurs ont été précurseurs pour l'identification des homologues dans les autres modèles. Cependant du fait de leur petite taille et des difficultés expérimentales pour les imager, ces cellules n'ont que peu contribué à la compréhension biophysique du processus d'alignement du fuseau. En effet, c'est par l'analyse quantitative des mouvements du fuseau et des noyaux en mitose, ainsi que par des perturbations physiques de la structure qu'il est possible d'en déduire le sens et l'intensité des forces exercées sur le fuseau. Seules quelques études ont décrit un peu plus en détail ces mouvements. Des films en « time lapse » chez le rat, la souris ou encore le poulet ont montré que la plaque métaphasique se forme aléatoirement par rapport à la surface ventriculaire du cortex cérébral en développement. Puis le fuseau fait des mouvements de « rocking » jusqu'au début de l'anaphase. C'est-à-dire que chacun des pôles du fuseau fait des mouvements de balancier par rapport à l'axe apico-basal (Adams, 1996; Haydar et al., 2003; Roszko et al., 2006). Chez la drosophile, la déplétion de G α i conduit à des mouvements

excessifs du fuseau autour de l'axe apico-basal. Dans ces mutants il semble que le centrosome ne soit pas maintenu de manière aussi stable au cortex apical que dans un NB sauvage. À l'inverse, chez les mammifères c'est la surexpression de Gai ou de LGN qui conduit à de fortes oscillations des pôles du fuseau et des chromosomes du fait de la traction des microtubules astraux (Du and Macara, 2004). Le pool de NuMA cortical et la dynamique des microtubules sont également nécessaires pour l'élaboration de ce rocking. Enfin, Morin *et al.* montrent que, dans des progéniteurs neuraux d'embryons de poulet mutés pour la partie Nter de LGN (qui interagit avec Gai), les mouvements du fuseau sont limités (Morin et al., 2007). Du fait de la position aléatoire des chromosomes lors de la métaphase, ce sont les mouvements réduits ou à l'inverse les mouvements excessifs du fuseau mitotique qui conduisent à des défauts d'orientation. Comprendre l'origine de ces oscillations devrait permettre de mieux décrire la balance des forces participant au positionnement du fuseau.

L'analyse de la balance des forces a été en revanche bien étudiée lors de la division asymétrique de l'embryon précoce du nématode *C. elegans*. L'analyse des mutants affectant cette division asymétrique a permis de mettre en évidence, en parallèle des découvertes faites chez la drosophile et les vertébrés, les molécules clés dont nous avons parlé précédemment. Les approches mécaniques réalisées sur l'embryon de *C. elegans* ont cependant éclairées de manière nouvelle ces travaux, et permis notamment d'explorer la balance des forces impliquées dans le positionnement du fuseau. Nous allons voir qu'au cours de la première division de l'embryon de *C. elegans*, les mouvements des pronoyaux et du fuseau mitotique sont très stéréotypés, et grâce à la grande taille de la cellule la caractérisation de ces mouvements a été très informative (voir § II.A.).

II. La division asymétrique dans l'embryon de *Caenorhabditis elegans*

II.A. *Caenorhabditis elegans* : organisme modèle

Au début des années 1970, Sydney Brenner, recherchant un organisme permettant une approche génétique du développement et du système nerveux, décide d'utiliser le ver non pathogène *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) comme modèle d'étude (Brenner, 1974; Sulston and Brenner, 1974). Il appartient à l'embranchement des nématodes, qui représente

les vers ronds non segmentés. Présentant en effet de nombreux avantages, il est aujourd'hui largement utilisé comme organisme modèle:

- il est petit (l'hermaphrodite adulte mesure environ 1 mm de long) et est bactériovore. Au laboratoire, on peut le manipuler aisément sur petites boîtes de Pétri, en le nourrissant d'*Escherichia coli* (*E. coli*).

- il est transparent, ce qui permet la visualisation des structures internes au microscope en optique de Contraste Interférentiel Différentiel (DIC),

- il possède un cycle de reproduction court (3,5 jours à 20°C) (Figure 16),

- son lignage cellulaire est invariant et connu depuis 1983 (959 cellules somatiques pour l'hermaphrodite adulte) (Sulston et al., 1983),

- il est hermaphrodite et s'autoféconde, mais des mâles existent et permettent les croisements indispensables à l'étude génétique,

- enfin, les souches peuvent être congelées ce qui facilite la maintenance.

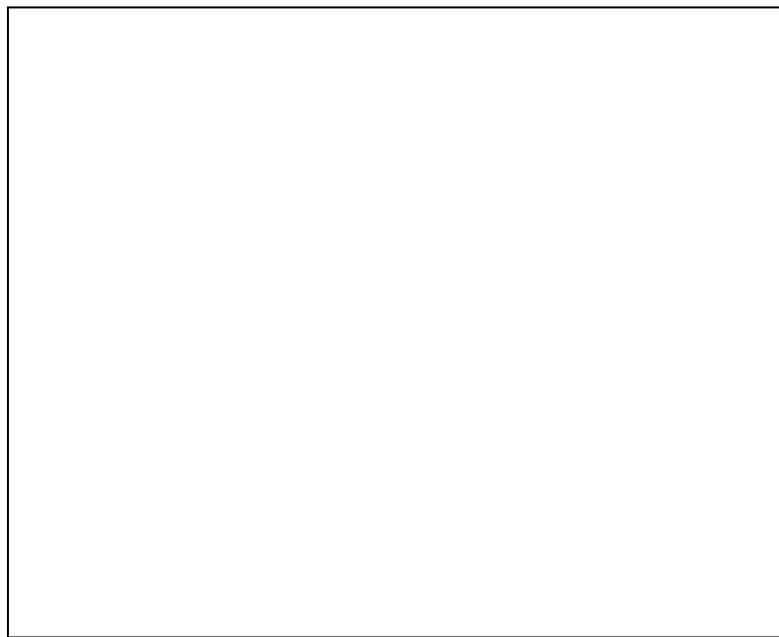


Figure 16: Cycle de développement d'un embryon de *C. elegans* au stade adulte.

L'embryon de *C. elegans* est pondu au stade gastrula. Il va ensuite se développer en quatre stades larvaires (L1-L4) avant de devenir un jeune adulte capable de pondre.

En cas de stress environnemental, les larves L1 vont arrêter leur développement puis entrer en *dauer*. Les vers vont pouvoir rester dans cet état de transition pendant plusieurs mois jusqu'au retour de conditions plus favorables pour leur développement. (Schéma extrait de Wormatlas©)

En 1998, *C. elegans* est le premier organisme multicellulaire dont le génome a été séquencé dans sa totalité (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). De nombreuses lignées transgéniques stables exprimant des protéines d'intérêt fusionnées à différents fluorophores sont disponibles dans cette espèce. C'est également dans cette espèce que le phénomène de RNA interference (RNAi) a été découvert (Fire et al., 1998). La technique est actuellement utilisée en routine et est également très simple à mettre en œuvre. *C. elegans* est donc rapidement devenu un puissant modèle pour la compréhension des mécanismes au niveau moléculaire.

Enfin, depuis la fin des années 1980, *C. elegans* est également un très bon outil pour la biologie cellulaire (Schierenberg, 1987). Les divisions mitotiques sont très rapides et très stéréotypées et ce dès la première division de l'embryon. L'embryon au stade 1 cellule, c'est à dire juste après la fécondation, fait 50 µm de long sur 30 µm de large, offrant une importante résolution spatiale pour la caractérisation des événements cellulaires. Dans cette espèce, la fécondation induit une polarisation rapide de la cellule. Pendant la première mitose, le fuseau s'oriente le long de cet axe de polarité, et se positionne asymétriquement en anaphase. Ainsi, la première division embryonnaire est typiquement asymétrique, en taille et en devenir des deux cellules filles. La rapidité de cette première division (20 minutes en moyenne) ainsi que l'excellente imagerie que l'on obtient en optique DIC ont ainsi fait de l'embryon de *C. elegans* un puissant modèle pour l'étude de la division asymétrique.

Comment se déroule cette première division asymétrique chez *C. elegans* ? *C. elegans* étant un hermaphrodite qui s'autoféconde, les ovocytes s'accumulent dans la gonade avant d'entrer dans la spermathèque où ils sont fécondés (Figure 17).



Figure 17: Photo d'un nématode *C. elegans* hermaphrodite adulte en optique DIC.

L'adulte fait 1 mm de long. La tête se situe à gauche et la queue à droite. *C. elegans* a deux gonades (une antérieure et une postérieure) dans laquelle les ovocytes vont maturer et s'accumuler devant la spermathèque où ils sont ensuite fécondés. Après fécondation les embryons se développent dans l'utérus puis sont pondus au stade gastrula. (Photo de Bob Goldstein, extraite de Wormbook.org)

Juste avant la fécondation, le noyau de l'ovocyte est bloqué en métaphase de méiose I et est positionné du côté le plus éloigné de la spermathèque. À la fécondation ce noyau va terminer ses cycles de méiose. Dans un embryon sauvage, les spermatozoïdes entrent par le côté de l'ovocyte qui leur est présenté en premier ce qui déclenche la fin de la méiose. Le pronoyau femelle nouvellement formé et le pronoyau mâle se retrouveront aux pôles opposés de la cellule. Le point d'entrée du spermatozoïde définira le pôle postérieur de l'embryon (voir § II.B.1). Le pronoyau femelle va ensuite migrer vers le pronoyau mâle (Figure 18A et B). Suite à l'entrée du spermatozoïde, des contractions du cytosquelette sont provoquées et culminent en générant transitoirement un sillon très marqué appelé « le pseudoclivage » (Figure 18A). Le complexe formé par les deux pronoyaux associés aux centrosomes (appelé « Nuclei Centrosome Complex » ou NCC) migre vers le centre de la cellule tout en effectuant une rotation de 90° qui aligne les asters selon l'axe antéro-postérieur (Figure 18C). Ce mécanisme est appelé « centration/rotation ». Une fois les asters alignés, les membranes nucléaires se rompent et le fuseau mitotique se forme (Figure 18D). Au cours de l'anaphase, les asters s'éloignent et subissent des oscillations transverses. L'amplitude des oscillations est proportionnelle au déplacement. Le déplacement de l'aster postérieur étant plus important que celui de l'aster antérieur, il en résulte un déplacement global du fuseau mitotique vers le pôle postérieur (Figure 18E). En fin de mitose, le sillon de cytokinèse s'alignant au centre du fuseau mitotique, deux cellules filles de tailles différentes se forment : une grande cellule AB antérieure et une plus petite P1 postérieure (Figure 18F).

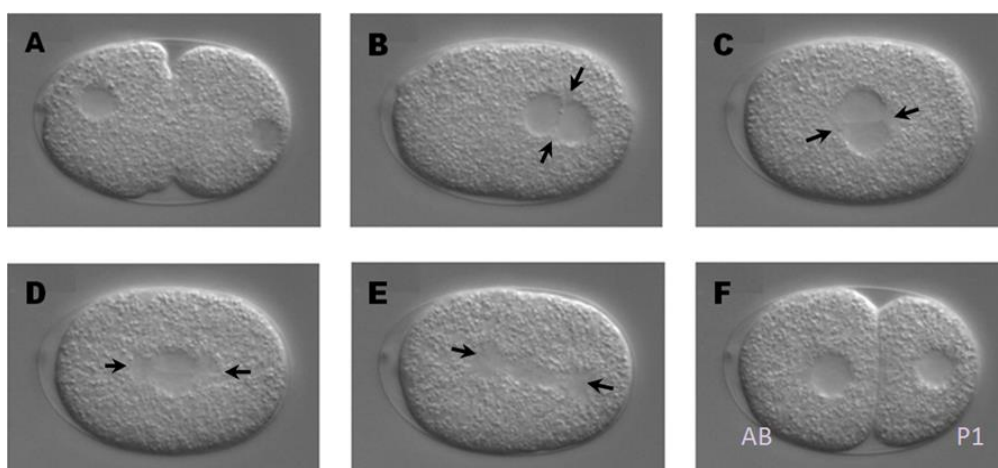


Figure 18: Clichés de la première division embryonnaire de *C. elegans* filmé en optique DIC x100.

Le pôle antérieur est à gauche, le pôle postérieur est à droite et les centrosomes sont indiqués par des flèches. **A)** Pronoyaux mâle (droite) et femelle (gauche) **B)** Rencontre des pronoyaux au pôle postérieur **C)** Centration et Rotation du complexe Noyaux/Centrosomes **D)** Rupture des enveloppes nucléaires **E)** Déplacement du fuseau mitotique vers le pôle postérieur **F)** Stade deux-cellules.

Grâce à la transparence de la cellule et aux mouvements stéréotypés des pronoyaux et du fuseau mitotique visibles en DIC, de nombreux cribles visuels ont été réalisés afin d'identifier des mutants affectés pour cette première division asymétrique, principalement des mutants dans lesquels la première division est symétrique. Ainsi des mutagénèses (dirigées ou non) et des cribles fonctionnels par RNAi sur tout le génome ont permis l'identification de nombreux gènes essentiels (Gönczy et al., 2000; Zipperlen et al., 2001). Par exemple la plupart des protéines impliquées dans l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire, les protéines PARs, ont initialement été identifiées grâce à l'étude de la première division embryonnaire de l'embryon de *C. elegans* (Kirby et al., 1990). Les cribles fonctionnels ont également permis d'identifier des protéines intervenant dans chacune des étapes de la division : migration des pronoyaux, élongation du fuseau mitotique, cytokinèse...(Gönczy et al., 1999). *C. elegans* est ainsi rapidement devenu un modèle expérimental pour l'étude du positionnement du fuseau car il permet la combinaison d'approches génétiques, biochimiques (utilisation de drogues affectant le cytosquelette) ou encore biophysiques (destruction laser ciblée de structures intracellulaires).

II.B. Mise en place de la polarité cellulaire dans l'embryon de *C. elegans*

Avant la fécondation, l'embryon de *C. elegans* n'est pas polarisé. L'entrée du spermatozoïde dans la cellule conduit à un réarrangement des molécules corticales et cytoplasmiques selon le plus grand axe de la cellule qui est l'axe antéro-postérieur, le point d'entrée du spermatozoïde définissant le futur pôle postérieur (Goldstein and Hird, 1996).

Classiquement, la mise en place de la polarité implique les protéines PAR (PARTition defective). Elles sont toutes initialement uniformément réparties dans l'ovocyte. PAR-3 et PAR-6 sont des protéines contenant un domaine PDZ et forment un complexe avec la protéine kinase C atypique PKC-3. Après la fécondation, PAR-3, PAR-6 et PKC-3 se localisent au niveau du cortex antérieur. Ces protéines sont mutuellement exclusives de la protéine à domaine « RING finger » PAR-2 et de la kinase PAR-1, qui sont restreintes de ce fait au cortex postérieur (Figure 20) (Rose and Gönczy, 2014). Cette localisation des PARs comprend deux phases: une première phase d'établissement, puis une seconde phase de maintenance. L'utilisation de lignées fluorescentes exprimant PAR-2 fusionnée à la Green Fluorescent Protein (GFP) (GFP::PAR-2) ou GFP::PAR-6 montre qu'après la fécondation, PAR-6 peut se localiser antérieurement en l'absence de PAR-2. Cependant, PAR-6 ré-envahit rapidement le

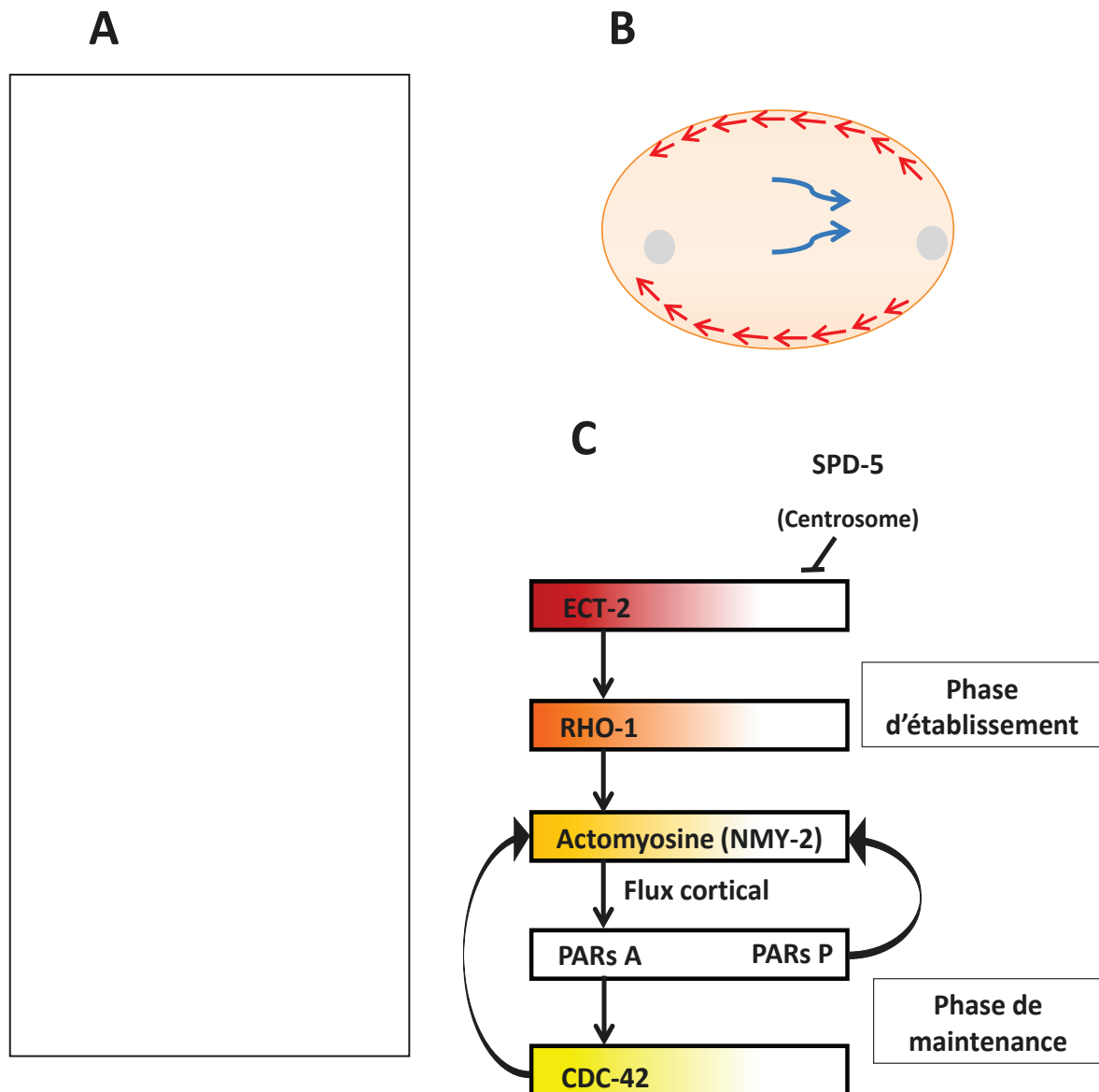


Figure 19: Mise en place de la polarité dans l'embryon de *C. elegans* au cours de la première division asymétrique.

A- Embryon exprimant les protéines PAR6 ::mcherry (en rouge) et PAR-2 ::GFP (en vert).

Il existe 2 phases pour l'établissement de la polarité. Lors de la première phase dite d'établissement le complexe PAR-3/PAR-6/PKC-3 va s'enrichir à l'antérieur. Ces protéines sont mutuellement exclusives des protéines PAR-2 et PAR-1, qui sont restreintes de ce fait au cortex postérieur. La polarité de la cellule est ainsi établie mais ne peut être maintenue qu'en présence de PAR-2 au cortex postérieur.

(Snapshot extrait d'un film de Schonnegg *et al.*, 2007)

B- Schématisation du flux cortical et du flux cytoplasmique

Le flux cytoplasmique (en bleu) est dirigé du côté antérieur vers le postérieur, le flux cortical (rouge) se déplace du côté postérieur vers l'antérieur.

C- Régulation du réseau d'actomyosine lors de la mise en place de la polarité dans l'embryon de *C. elegans*.

En réponse au signal apporté par le centrosome du spermatozoïde, ECT-2 positionnée à l'antérieur active sa cible RHO-1 qui va stabiliser le réseau d'actomyosine. Le flux généré va entraîner l'établissement des PARs.

Cette polarité entraîne la localisation de CDC-42 qui à son tour va agir sur l'actine pour maintenir la polarité.

Une fois localisées, les PARs vont également participer à la régulation du réseau d'actomyosine.

(Schéma adapté de Motegi *et al.*, 2006)

cortex postérieur en l'absence de PAR-2. D'autre part, en l'absence de PAR-6, PAR-2 n'est jamais localisée asymétriquement et reste uniformément répartie autour du cortex et dans le cytoplasme. Il existe donc une première phase dite d'établissement de la polarité, où le complexe PAR-3/PAR-6/PKC-3 est enrichi à l'antérieur indépendamment de PAR-2. La polarité de la cellule est ainsi établie mais ne peut être maintenue qu'en présence de PAR-2 au cortex postérieur (Figure 19A).

II.B.1. Initiation de la polarisation dans l'embryon de *C. elegans*

Goldstein montre en 1996 que le signal déclenchant la rupture de la symétrie serait apporté par le spermatozoïde lors de la fécondation de l'ovocyte. Comme décrit précédemment, du fait de la conformation de la gonade, l'ovocyte est toujours fécondé du côté opposé au pronoyau femelle. L'utilisation de mutants pour lesquels le passage des ovocytes dans la spermathèque est accéléré permet de rendre aléatoire la position d'entrée du spermatozoïde. Ces expériences ont montré que la cellule P1 postérieure se développe toujours du côté par lequel le spermatozoïde est entré et ce même si le site d'entrée se trouve du côté du pronoyau de l'ovocyte (Figure 20). C'est donc le point d'entrée du spermatozoïde qui dicte la position du pôle postérieur de l'embryon (Goldstein and Hird, 1996).

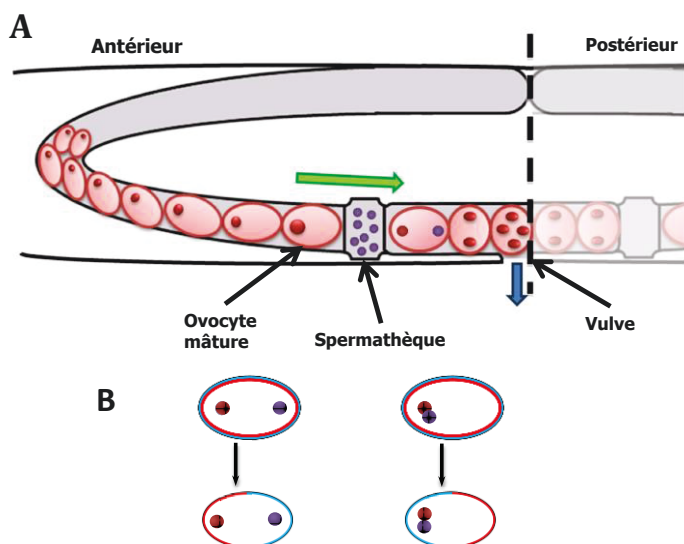


Figure 20: Schéma d'une gonade de *C. elegans*.

A) *C. elegans* possède une gonade syncytiale symétrique. L'ovocyte mature entre dans la spermathèque pour être fécondé, puis l'embryon est expulsé par la vulve lorsqu'il atteint le stade de gastrula. B) Le point d'entrée du spermatozoïde définit le futur pôle postérieur (en bleu). Le pôle antérieur est marqué en rouge.

Une autre étude montre que la forte association du pronoyau mâle (et de ses centrosomes) avec le cortex est un élément important pour la mise en place de la polarité. Des mutations dans les sous-unités du complexe APC (Anaphase Promoting Complex) ou de

protéines impliquées dans la synthèse *de novo* des acides gras montrent un défaut de cette association pronoyau mâle/cortex (Rappleye et al., 2002, 2003).

En 2000, Wallenfang *et al.* montrent que la polarisation de la cellule est initiée par une forte concentration de microtubules plutôt que par le spermatozoïde en lui-même. En effet le spermatozoïde, en plus de son ADN, apporte avec lui deux centrioles qui permettent l'établissement des centres organisateurs de microtubules (MTOC) et l'accumulation de PAR-2 au cortex postérieur corrèle avec l'apparition du MTOC (Cuenca et al., 2003; Wallenfang and Seydoux, 2000). Ceci est démontré par l'utilisation de mutants thermosensibles *mat* (*metaphase to anaphase transition*). Ce sont des mutants du cycle cellulaire qui prolongent anormalement la durée de la métaphase de méiose I de l'ovocyte. Après fécondation l'embryon va alors avoir le fuseau méiotique de l'ovocyte bloqué en métaphase I d'un côté et l'ADN du spermatozoïde de l'autre, mais ce dernier reste sous forme condensée. Les embryons vont finalement se développer et établir une polarité. Mais cette polarité est inversée avec PAR-2 localisée au cortex proche du noyau de l'ovocyte. L'altération de ce fuseau méiotique par un traitement au nocodazole qui dépolymérise les microtubules ou par un RNAi contre *ncc-1* qui permet l'entrée en phase M, empêche la mise en place de cette polarité inversée. Ceci indique qu'un fuseau localisé de manière ectopique peut initier la polarisation. Par ailleurs, les auteurs montrent que la déplétion de la sérine/thréonine kinase AIR-1 (Aurora A,) qui est indispensable à la formation de l'aster spermatique, entraîne une perte de polarité cellulaire. Ces travaux suggèrent que le signal nécessaire et suffisant pour l'établissement de la polarité serait une concentration localisée de microtubules. Dans un embryon sauvage, le centrosome apporté par le spermatozoïde initie une forte nucléation de microtubules (bien plus robuste que celle du fuseau méiotique en train de se désagréger) et polarise la cellule. Quand l'embryon est bloqué en méiose, l'aster spermatique est très réduit et le fuseau méiotique nucléé suffisamment longtemps les microtubules pour initier la polarisation (Wallenfang and Seydoux, 2000). Les travaux ultérieurs de Cowan et Hyman démontrent cependant que la polarité est établie indépendamment des microtubules. En effet, la déplétion de la γ -tubuline (qui agit en aval de AIR-1) par RNAi, qui empêche la nucléation des microtubules, n'affecte en aucun cas l'établissement de la polarité, de même que le RNAi de l' α ou la β -tubuline ou un traitement précoce au nocodazole. En revanche, la déplétion de SPD-2 ou SPD-5 (deux protéines à domaine super-enroulé), qui sont des

composants essentiels des centrosomes permettant le recrutement du matériel péricentriolaire (PCM), entraîne un défaut de polarisation (Cowan and Hyman, 2004). En utilisant des lignées GFP::SPD-2 qui permettent la visualisation des centrosomes très tôt après la fécondation, une ablation au laser des centrosomes a été réalisée. Ceci a montré que le centrosome est requis précocement lors de l'initiation de l'établissement de la polarité. Par contre, une ablation tardive du centrosome n'empêche pas la mise en place des domaines PARs. Ceci semble donc indiquer que le centrosome est nécessaire à l'établissement de la polarité (et pas à son maintien), et que cette fonction est indépendante de son rôle dans la nucléation des microtubules. En revanche, il requiert l'intervention des protéines centrosomales SPD-2 et SPD-5. Enfin en 2007, une nouvelle étude de Tsai *et al.* montre que l'immunomarquage d'embryons déplétés en tubuline ou traités au nocodazole permet toujours de détecter de la tubuline bien qu'elle soit fortement réduite, remettant ainsi en cause les résultats de Cowan et Hyman sur les RNAi contre la tubuline (Tsai and Ahringer, 2007).

En conclusion, le rôle joué par les microtubules en amont des protéines PARs dans l'établissement de la polarité antéro-postérieure de l'embryon précoce de *C. elegans* est encore controversé. Notamment un mécanisme d'action des microtubules sur la rupture de la symétrie est encore à découvrir. Toutefois, que le signal de polarisation provienne de la fonction de nucléation ou des composants même du centrosome, ce signal est clairement initié par le MTOC du spermatozoïde.

II.B.2. Contractilité du réseau d'actomyosine et polarisation

Le second évènement primordial pour l'établissement de la polarité est la déstabilisation du réseau d'actomyosine au postérieur de la cellule qui va initier un flux permettant de transporter les protéines (Figure 21). Très tôt, son importance dans la polarisation de l'embryon précoce de *C. elegans* a été mise en évidence. Le traitement des embryons à la cytochalasine D (un inhibiteur de la polymérisation de l'actine), au moment de la migration des pronoyaux, provoque une perte du pseudoclivage, un défaut de migration du pronoyau femelle qui s'arrête au centre de la cellule et l'absence de déplacement postérieur du fuseau mitotique. Ceci conduit à une division symétrique qui traduit une perte de polarité (Hill and Strome, 1988). De plus, l'analyse du déplacement des granules vitellins en optique DIC met en évidence des flux qui sont dépendants des microfilaments d'actine

mais pas des microtubules (Hird and White, 1993). Il y a un flux cytoplasmique dirigé du côté antérieur vers le postérieur alors que les granules à proximité du cortex se déplacent du côté postérieur vers l'antérieur, c'est le flux cortical. Le flux cytoplasmique se fait toujours en direction du spermatozoïde (soit vers le futur pôle postérieur) et ce quel que soit le site d'entrée du spermatozoïde (Goldstein and Hird, 1996) (Figure 19B).

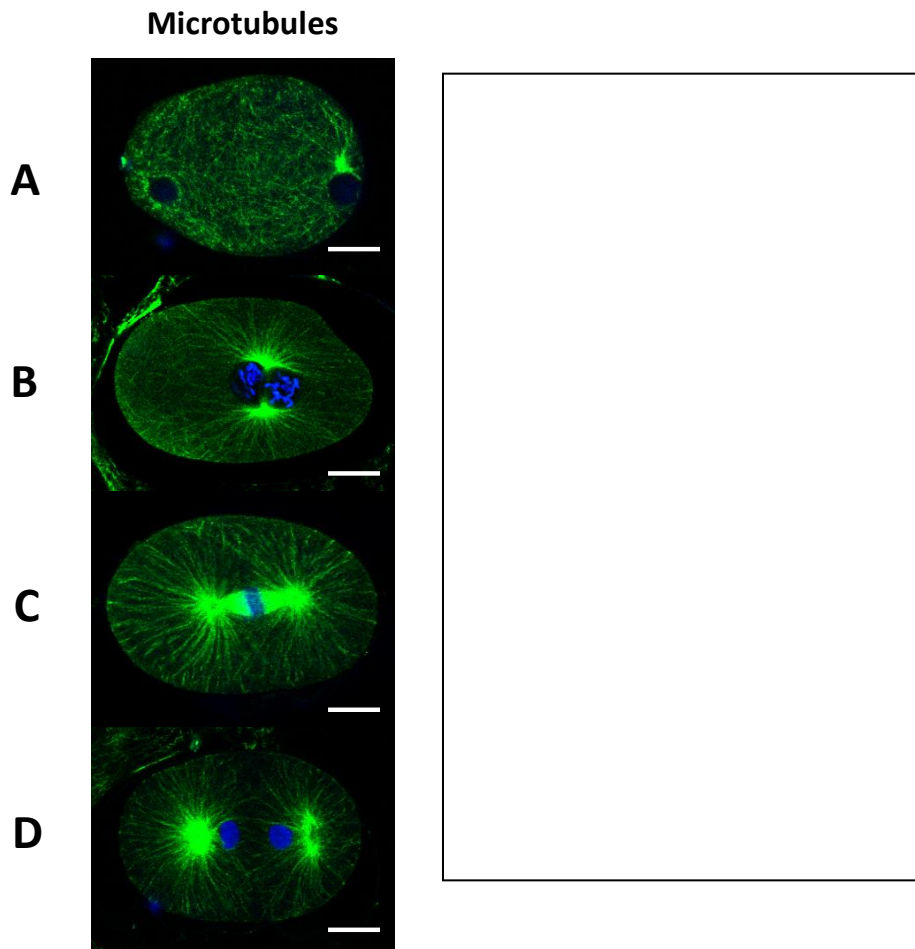


Figure 21: Réseaux de microtubules et d'actomyosine dans l'embryon de *C. elegans*.

Panel de gauche

Immunofluorescences du réseau de microtubules (A, B, C, D) marqués par un anticorps anti- α -tubuline (vert). L'ADN est marqué au Hoechst (bleu). La barre d'échelle = 10 μ m.

A) Les pronoyaux se trouvent à chaque pôle de la cellule. **B)** Centration/Rotation **C)** Anaphase. **D)** Fin de télophase. Le réseau de microtubules devient de plus en plus dense au cours de la division.

Panel de droite (extrait de Munro *et al.*, 2004)

Photographies du réseau d'actomyosine extraites d'un film d'une lignée GFP::*NMY-2* de la fécondation **(a)** au pseudoclivage **(c)**. L'astérisque bleu désigne l'aster spermatique. On peut noter un déplacement vers l'antérieur des foci de myosine au cours du temps.

Par la suite, un mutant de la myosine non musculaire de type II (NMY-2), une protéine motrice qui interagit avec l'actine pour générer des contractions, confirme que la contractilité de l'actine est essentielle à la polarisation de l'embryon. NMY-2 a été mise en évidence du fait de son interaction avec le domaine Cter de PAR-1 et est nécessaire dans l'embryogenèse. Sa déplétion entraîne une perte de la polarité qui génère également une division symétrique (Guo and Kemphues, 1996). Dans des lignées GFP::NMY-2, on observe des foci sous le cortex se déplaçant au cours du temps. Durant l'établissement de la polarité, le réseau d'actomyosine se désassemble à proximité de l'aster du spermatozoïde, c'est-à-dire au niveau du futur pôle postérieur, et les foci de NMY-2 s'accumulent vers le futur pôle antérieur (Munro et al., 2004). En observant la localisation de GFP::PAR-6 sous le cortex, Munro *et al.* montrent que PAR-6 suit le même mouvement que les foci de NMY-2 de même que la F-actine qui colocalise avec NMY-2 en immunomarquage (Munro et al., 2004). Ainsi, ce flux cortical d'actomyosine participe au positionnement de PAR-6 à l'antérieur de la cellule. Cette partie antérieure reste très contractile du fait de l'accumulation de l'actine et de la myosine. À l'inverse la partie postérieure devient plus rigide. Cette inhibition postérieure de la contractilité est initiée par le MTOC du spermatozoïde. En réponse, les protéines PAR-2 puis PAR-1 vont envahir le cortex postérieur. En l'absence de NMY-2 des immunomarcages montrent que PAR-6 est localisée tout autour du cortex au lieu d'être restreinte au cortex antérieur (Munro et al., 2004). L'analyse plus fine de la dynamique de localisation des PARs grâce aux lignées GFP::PAR-2 et GFP::PAR-6 montre qu'en l'absence de NMY-2, PAR-6 n'est pas déplacée lors de la première phase de la polarisation (Cuenca et al., 2003). NMY-2 est donc nécessaire pour l'établissement de la polarité dans l'embryon précoce. Mais alors que PAR-2 est indispensable au maintien de la polarité en excluant les PARs antérieures, cette protéine régule également le maintien de l'asymétrie du réseau d'actomyosine en inhibant le recrutement cortical de NMY-2 au postérieur (Munro et al., 2004).

Ainsi au pôle postérieur de la cellule, au contact du spermatozoïde et de son MTOC, le cytosquelette est déstabilisé. Ceci initie un flux cortical d'actomyosine qui transporte PAR-3, PAR-6 et PKC-3 vers le pôle antérieur. En contrepartie PAR-2 va envahir le cortex postérieur pour permettre le maintien de l'asymétrie aussi bien en excluant les PARs

antérieurs qui pourraient revenir via le flux cytoplasmique qu'en maintenant le flux antérieur d'actomyosine.

L'importance de l'actomyosine dans la polarisation de la cellule a été ensuite confirmée par l'implication des régulateurs de l'actine, tels que RHO-1, CYK-4, ECT-2 et CDC-42. L'inactivation d'un de ces gènes entraîne des défauts de polarisation ainsi que des défauts du positionnement du fuseau mitotique (Jenkins et al., 2006; Motegi and Sugimoto, 2006; Schonegg and Hyman, 2006). CYK-4 est une protéine GAP (Guanosine triphosphatase Activating Protein) très enrichie dans les spermatozoïdes. Après fécondation, elle est enrichie au cortex postérieur aussi bien dans un embryon sauvage que dans un embryon déplété pour la protéine CYK-4 maternelle (Jenkins et al., 2006). D'autre part, des lignées exprimant GFP::ECT-2, un Guanine Exchange Factor (GEF) qui active RHO-1, et GFP::RHO-1, montrent que ces protéines s'enrichissent progressivement au cortex antérieur après la fécondation (Jenkins et al., 2006; Motegi and Sugimoto, 2006). Les défauts impliqués par la perte de ces protéines s'expliquent en observant la structure du réseau d'actomyosine et la localisation des protéines PARs. Dans des embryons *rho-1* ou *ect-2* (*RNAi*), GFP::PAR-6 et GFP::MOE (la moesine (MOE) permettant de suivre la F-actine comme NMY-2), ne sont pas enrichies au cortex antérieur et leur quantité sont fortement diminuées par rapport à un embryon sauvage (Motegi and Sugimoto, 2006). Plus précisément, en l'absence de *rho-1* ou *ect-2*, il n'y a plus de coalescence des foci de NMY-2::GFP. Le réseau reste alors fin et dispersé et il perd sa contractilité (Jenkins et al., 2006; Schonegg and Hyman, 2006). L'absence de *cyk-4* provoque un phénotype différent. Les foci peuvent fusionner mais il n'y a plus d'asymétrie le long de l'axe antéro-postérieur. Le réseau est alors dynamique tout autour du cortex (Jenkins et al., 2006). Ceci corrèle aussi avec le fait que la localisation de la Myosine regulatory Light Chain phosphorylée (phospho-MLC-4), qui est un marqueur de la contractilité de l'actomyosine, est perdue en absence de *ect-2* et *rho-1* et conservée en absence de *cyk-4* (Jenkins et al., 2006). Ainsi ECT-2 et RHO-1 sont indispensables à la formation et à la contractilité du réseau d'actomyosine alors que CYK-4 permet de l'inhiber au pôle postérieur et initier l'asymétrie du réseau d'actomyosine (Jenkins et al., 2006; Motegi and Sugimoto, 2006; Schonegg and Hyman, 2006).

De plus, la localisation de ECT-2 est affectée en l'absence de SPD-5 mais pas dans les mutants *rho-1*. Ainsi, bien que CYK-4 soit présent immédiatement après la fécondation, ce

n'est qu'en réponse au signal SPD-5 de l'aster spermatique mature qu'ECT-2 va être entraînée antérieurement, ce qui va provoquer le déplacement de sa cible RHO-1. Le déplacement de RHO-1 va générer une vague de contractilité du cytosquelette qui entraîne le complexe PAR-3/PAR-6 au pôle antérieur (Jenkins et al., 2006; Motegi and Sugimoto, 2006).

La GTPase CDC-42 en revanche est enrichie plus tardivement au pôle antérieur. De plus, sa localisation asymétrique est perdue dans les embryons *nmy-2*, *ect-2* ou *rho-1 (RNAi)* alors qu'elle est conservée dans des embryons *par-6 (RNAi)*. Ceci montre que CDC-42 contrairement à RHO-1 est déplacée par le flux d'actomyosine. Immédiatement après la fécondation, les PARs antérieures et postérieures colocalisent sur tout le cortex. Ce n'est qu'au cours de la méiose II que PAR-2 quitte le cortex pour ne revenir au postérieur qu'une fois le MTOC du spermatozoïde formé. En absence de CDC-42, PAR-2::GFP est localisée tout autour du cortex, et ce même en méiose II, suggérant qu'en l'absence de CDC-42 le complexe PAR-3/PAR-6 n'est plus capable d'exclure PAR-2 du cortex antérieur. Le marquage de PAR-6 montre qu'il est absent du cortex dès la phase d'établissement et ne revient à aucun moment au cours de la division (Schonegg and Hyman, 2006). CDC42 et PAR6 interagissent physiquement en double hybride (Gotta et al., 2001) mais l'absence de PAR-6 au cortex n'est pas due à la perte d'interaction avec CDC-42 mais plutôt à la localisation aberrante de PAR-2. En effet, la double inactivation de *cdc-42 (RNAi)* ; *par-2 (RNAi)* permet de restaurer le domaine cortical antérieur de PAR-6 bien que le niveau d'expression soit plus faible (Schonegg and Hyman, 2006). CDC-42 est donc essentielle pour la maintenance des domaines corticaux requis à la fois pour exclure PAR-2 du cortex après la fécondation et pour localiser PAR-6.

CYK-4 est donc la protéine qui fait le lien d'un point de vue moléculaire entre la polarité et la fécondation. Cette protéine est apportée par le spermatozoïde et va inhiber le réseau d'actomyosine au postérieur au niveau du point de contact. ECT-2 qui était localisée uniformément avant la polarisation va alors être exclue du postérieur par le signal du MTOC mature du spermatozoïde (dont SPD-5 fait partie) de même que sa cible RHO-1. Ceci génère un gradient de contractilité (dépendant d'une activation différentielle de MLC-4) qui initie un flux contractile asymétrique qui va transporter les PARs ainsi que CDC-42 à l'antérieur ou CDC-42 maintient les domaines asymétriques antérieurs et postérieurs (Figure 19C).

Une fois mises en place, les PARs vont contribuer à la régulation du réseau d'actomyosine. PAR-3 régule positivement la vitesse des mouvements corticaux antérieurs, des mutants pour *par-3* présentent des défauts dans la distribution de l'actine. PAR-2 à l'inverse régule négativement la myosine en empêchant NMY-2 de s'associer au cortex (Cheeks et al., 2004; Munro et al., 2004).

II.C. La polarisation est traduite en forces asymétriques pour positionner le fuseau mitotique

La mise en place de la polarité est essentielle car elle contrôle en amont la localisation asymétrique de tous les déterminants cellulaires, ainsi que le positionnement asymétrique du fuseau mitotique. En cas de défaut, l'embryon se divise pour donner naissance à deux cellules filles de taille équivalente et/ou de devenir identique, ce qui entraîne par la suite des défauts développementaux qui conduisent à une létalité embryonnaire.

Comment le positionnement du fuseau se fait-il ? Se fait-il grâce à une traction exercée du côté postérieur ? Est-il poussé de manière plus importante au niveau du cortex antérieur ? Ou encore existe-t-il une force asymétrique de propulsion intrinsèque au fuseau ? Toutes ces possibilités peuvent conduire à un positionnement postérieur du fuseau. Des données montrent que le déplacement du fuseau en anaphase est principalement dû à des forces de traction (Grill et al., 2001). Dans ces expériences, les microtubules du fuseau central sont coupés en début d'anaphase. Ceci entraîne une accélération des asters vers les pôles de la cellule, l'aster postérieur se déplaçant plus rapidement que l'aster antérieur. Cette expérience de rupture du fuseau fut ensuite répétée dans des embryons mutés pour *par-2* ou *par-3*. Dans un embryon mutant pour *par-2*, les vitesses de déplacement des centrosomes antérieur et postérieur sont égales et sont de valeur égale à la vitesse de déplacement du centrosome antérieur d'un embryon sauvage (donc faibles). Dans un embryon mutant pour *par-3*, les vitesses de déplacement des centrosomes antérieur et postérieur sont aussi égales mais sont similaires à la vitesse de déplacement du centrosome postérieur d'un embryon sauvage (donc fortes). Ces expériences confirment que les forces de traction sont régulées en amont par les PARs et que les forces générées du côté de PAR-2 (postérieur) sont plus importantes que celles générées du côté de PAR-3 (antérieur) (Grill et

al., 2001 ; Figure 22). L'asymétrie dans ces forces de traction est responsable du déplacement postérieur du fuseau. Mais comment les domaines protéiques PAR contrôlent-ils les forces à chaque pôle ? Par quel mécanisme le signal de polarisation est transduit en mécanisme de positionnement du fuseau ?

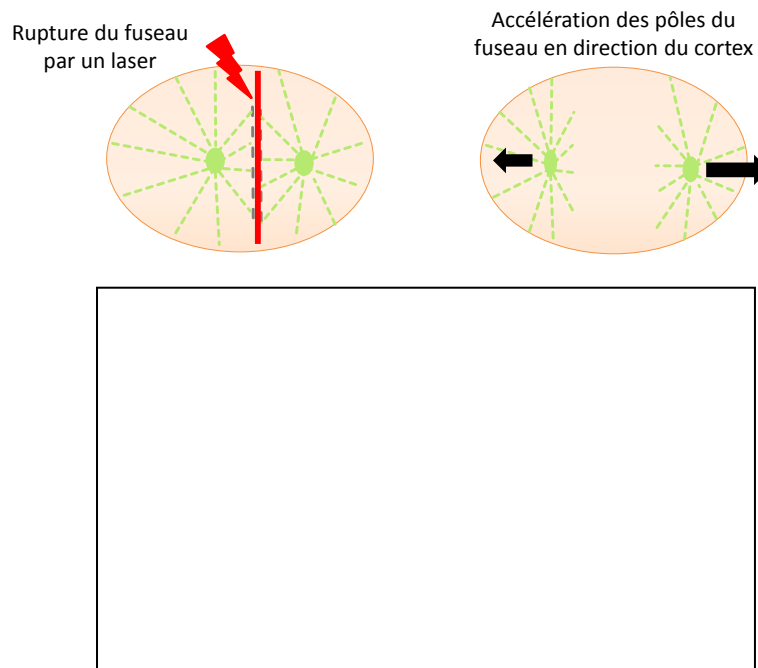


Figure 22: Moyenne de l'augmentation des pics de vitesse de déplacement des centrosomes après rupture du fuseau par un laser.

Dans un embryon mutant pour *par-2* les vitesses de déplacement des centrosomes antérieur et postérieur sont égales. Elles sont de valeur égale à la vitesse de déplacement du centrosome antérieur d'un embryon sauvage (WT irr, donc faibles).

Dans un embryon mutant pour *par-3* les vitesses de déplacement des centrosomes antérieur et postérieur sont aussi égales. Elles sont de valeur égale à la vitesse de déplacement du centrosome postérieur d'un embryon sauvage (WT irr, donc fortes)

Les histogrammes de gauche indiquent l'accélération des pôles du fuseau d'un embryon sauvage en absence de rupture du fuseau.

L'inactivation de la kinésine MCAK entraîne aussi une accélération des pôles du fuseau après rupture du fuseau.

A= antérieur, P= postérieur. (Graphes extraits de Grill *et al.*, 2001)

II.C.1. Protéines intervenant dans le mécanisme de positionnement

La transduction du signal de polarisation se fait par la régulation d'un complexe protéique cortical dont la localisation est dépendante des protéines de polarité. Comme dans beaucoup d'autres modèles, les premiers acteurs identifiés dans le mécanisme de positionnement des noyaux et du fuseau furent les microtubules. Au cours de la première division asymétrique de *C. elegans*, le réseau de microtubule est très dense. Leur rôle dans la

division asymétrique de l'embryon a d'abord été testé en utilisant du nocodazole, une drogue qui provoque la dépolymérisation des microtubules. Les embryons très précoces sont perméables, car leur coquille n'est pas encore totalement formée, et sont seulement plongés dans la drogue diluée dans un milieu isotonique. En revanche les embryons plus vieux sont imperméables aux drogues. La coquille est alors percée de manière très précise par l'intermédiaire d'un laser pour faire pénétrer la drogue dans l'embryon. Après traitement, la migration du NCC est bloquée et un fuseau mitotique très court se forme en mitose au pôle postérieur de la cellule (Hird and White, 1993). Ceci montre que les mouvements asymétriques du NCC, ainsi que l'élongation du fuseau dépendent des microtubules astraux. En revanche, les contractions membranaires sont indépendantes des microtubules et le flux cytoplasmique est intact en présence de nocodazole (Hird and White, 1993). Bien plus tard, le rôle des microtubules put être précisé grâce à l'utilisation d'un mutant thermosensible dominant pour l'allèle de la β -tubuline (Nguyen-Ngoc et al., 2007). Les embryons sont cultivés et observés sous microscope à température permissive. Un choc thermique est ensuite appliqué pour inactiver la β -tubuline. L'inactivation en début de mitose entraîne un défaut d'élongation du fuseau mitotique et la perte des oscillations transverses. Dans un second temps, les auteurs montrent que la stabilisation des microtubules par le taxol affecte aussi le positionnement du fuseau. Pour que la drogue affecte la cellule spécifiquement en mitose, les embryons (imperméables) sont montés entre lame et lamelle dans du taxol. La coquille est ensuite percée, comme précédemment, par l'intermédiaire d'un laser, et ce, au moment voulu de la mitose afin de suivre les conséquences phénotypiques de la stabilisation des microtubules à un stade donné de la division. Étant donné les problèmes de diffusion de la drogue dans une cellule de si grande taille, la coquille a été percée à plusieurs endroits. Lorsque le taxol entre du côté antérieur de la cellule, le fuseau est court et positionné postérieurement. Si le taxol entre du côté postérieur, le fuseau est court et positionné antérieurement. Enfin, lorsque le taxol entre des deux côtés de la cellule, le fuseau est court et central et les oscillations des pôles sont inhibées (Nguyen-Ngoc et al., 2007). Aussi, les protéines TAC-1, ZYG-9 ou encore EFA-6, qui sont essentielles pour la régulation de la polymérisation des microtubules, une fois mutées entraînent des défauts de positionnement et d'élongation du fuseau mitotique (Bellanger and Gönczy, 2003; Bellanger et al., 2007; O'Rourke et al., 2010). Ces travaux montrent que

des microtubules longs sont indispensables pour l'élongation et la traction du fuseau mitotique, mais qu'une trop forte stabilité inhibe aussi cette traction. Ainsi, le positionnement du fuseau n'est possible que si les microtubules ont la capacité de polymériser jusqu'au cortex et de rester dynamique.

Tout comme il a été montré dans les autres modèles, les protéines hétérotrimériques G sont importantes dans la transduction du signal de polarité en signal de positionnement des noyaux et du fuseau. Chez *C. elegans*, il existe une vingtaine de gènes codant pour des protéines G α suggérant des redondances dans ces gènes. L'inactivation des gènes deux par deux a mis en évidence que l'inactivation conjointe de *goa-1* et de *gpa-16* conduisait à 100% de létalité embryonnaire. Ces embryons présentent une position centrale du fuseau et une élongation faible en anaphase, bien que la polarité ne soit pas affectée (Gotta and Ahringer, 2001). Elles agissent donc en aval des protéines PAR dans le contrôle des forces de traction. Cependant, ces protéines sont localisées uniformément autour du cortex, ainsi, que ce soit pour le déplacement antérieur des pronoyaux ou le déplacement postérieur du fuseau, l'asymétrie dans la régulation de l'activité de ces protéines doit se faire par l'intermédiaire d'autres molécules. Cette régulation passe en effet par les protéines GPR-1 et GPR-2 ainsi que par la protéine LIN-5.

LIN-5 a été identifiée très tôt comme requise pour la génération des forces de traction. Son inactivation conduit à un phénotype similaire à l'inactivation des G α avec un fuseau court et central. Mais cette protéine aurait également un rôle supplémentaire dans la rotation du NCC et plus précocement dans la rotation du fuseau méiotique (Lorson et al., 2000; van der Voet et al., 2009). Par la suite, une immunoprécipitation grâce à un anticorps anti-LIN-5 suivi d'une analyse par spectrométrie de masse identifia deux protéines à 97% identiques au niveau de leur séquence en acides aminés : GPR-1 et GPR-2 (pour *G Protein Regulator*) (Srinivasan et al., 2003). En parallèle, Gotta et Ahringer montrent que l'inactivation de l'un des deux gènes par RNAi inactive également le second du fait de leur forte similarité. Le phénotype associé à l'inactivation de *gpr-1/2* est très similaire à celui de *lin-5* ou de *goa-1 ; gpa-16* : un fuseau court, une perte des oscillations en anaphase et une division symétrique (Colombo et al., 2003; Gotta et al., 2003). Enfin, l'expérience de rupture du fuseau au laser, qui détermine quels types de force sont appliqués sur le fuseau, réitérée sur des embryons *gpr-1/2 (RNAi)* ou *goa-1 ; gpa-16 (RNAi)* montre une forte diminution de

l'accélération de chacun des asters par rapport à un embryon sauvage. De plus, les accélérations sont équivalentes pour les pôles antérieur et postérieur (Colombo et al., 2003). GPR-1/2 et LIN-5 sont donc impliquées dans la génération des forces de traction. Enfin LIN-5 et GPR-1/2 suivent la même dynamique de localisation. GPR-1/2 a besoin de LIN-5 pour se localiser au cortex. En revanche sur la quantité de protéines LIN-5 corticales, seule une partie a besoin de GPR-1/2 pour se localiser au cortex, un autre pool de protéines LIN-5 pouvant se fixer au cortex de manière indépendante (Park and Rose, 2008; Srinivasan et al., 2003). Les protéines ont toutes les deux un pattern bipolaire avec quand même un enrichissement au cortex antérieur lors de la prophase puis un enrichissement au cortex postérieur, de la métaphase à la fin de la mitose (Park and Rose, 2008). Cette localisation asymétrique de GPR-1/2 et LIN-5 est dépendante des protéines de polarité alors que l'absence de LIN-5 et GPR-1/2 n'affecte en aucun cas la localisation des protéines PARs (Colombo et al., 2003; Gotta et al., 2003; Park and Rose, 2008). L'enrichissement spatio-temporel de GPR-1/2 et LIN-5 corrèle avec l'orientation des forces de traction pendant le premier cycle embryonnaire, suggérant que leur localisation régule l'activation du complexe protéique générateur de force. Cette dynamique de localisation est encore mal comprise mais tous ces résultats montrent que GPR-1/2 et LIN-5 sont impliquées dans les forces permettant la traction des microtubules en aval du signal de polarisation.

Après l'identification de toutes ces protéines, il reste à comprendre comment se fait le lien avec la traction des microtubules. Certaines protéines associées aux microtubules ont un rôle de moteur moléculaire. C'est le cas de la dynéine qui se déplace vers l'extrémité négative du microtubule, soit l'extrémité qui est ancrée au centrosome. Cependant, cette protéine est impliquée dans la majeure partie des processus cellulaires. L'inactivation forte de *dlc-1* (*dynein light chain 1*) entraîne des phénotypes très précoces dans la première division comme par exemple l'absence de migration des pronoyaux. Il a également été montré que l'inactivation de la dynactine, qui est un complexe activateur de la dynéine, entraîne des défauts d'orientation du fuseau. Des expériences d'inactivation de gène par ARN anti-sens contre *dnc-1* (homologue de p150^{Glued}) ou *dnc-2* (homologue de p50) révèlent des défauts de rotation du NCC menant aux défauts d'orientation du fuseau en anaphase (Gönczy et al., 1999; Skop and White, 1998). Mais les défauts précoces des mouvements des pronoyaux empêchent d'estimer l'impact réel de ces protéines sur le positionnement du

fuseau. Ce n'est qu'en 2007 que le rôle de la dynéine a pu être vérifié. Chez *C. elegans*, l'inactivation de la dynéine en mitose par l'utilisation d'un mutant thermosensible de *dhc-1* (*dynein heavy chain*) entraîne une perte de l'élongation et des oscillations du fuseau. Aussi, des expériences d'immunoprécipitation ont montré que LIS-1, un composant de la dynéine, interagit directement avec LIN-5. De plus, tout comme GPR-1/2, LIN-5 coimmunoprécipite avec GOA-1 et GPA-16 (Nguyen-Ngoc et al., 2007). Ainsi la dynéine serait indirectement ancrée au cortex via un complexe $G\alpha$ /GPR-1/2/LIN-5. Lorsqu'un microtubule va croître jusqu'à la membrane, la dynéine va pouvoir interagir avec lui et "marcher" vers son extrémité "-", soit vers le centrosome. La dynéine étant retenue au cortex par le complexe $G\alpha$ /GPR-1/2/LIN-5, il en résulte une traction du microtubule. Nous avons également vu que la dynamique des microtubules est très importante pour l'élongation et le positionnement du fuseau, la stabilisation des microtubules par le taxol altérant ces processus (Nguyen-Ngoc et al., 2007). On peut enfin imaginer qu'un microtubule qui continue sa polymérisation, une fois arrivé au cortex, génère une force de propulsion sur le fuseau qui est contraire à la force de traction. Ainsi, le maintien du microtubule au cortex par le déplacement de la dynéine le long de celui-ci couplé à la dépolymérisation du microtubule est essentiel pour générer la force de traction (Nguyen-Ngoc et al., 2007).

Avant cette découverte de l'implication de la dynéine dans le complexe générateur de force, Kozlowski *et al.*, proposent un autre modèle pour expliquer le mécanisme de traction corticale. Ils le montrent en couplant l'analyse de lignées YFP:: α -tubuline et EBP-2::GFP, une protéine localisée uniquement à l'extrémité des microtubules en croissance (homologue d'EB1 chez l'homme). Ils constatent que certains microtubules persistent environ 1s au cortex une fois leur polymérisation achevée avant de subir une catastrophe. Ils constatent également que certains microtubules s'associent pour former des fibres qui vont persister à une position fixe le temps d'une oscillation complète du fuseau (25s) et ce indépendamment des catastrophes subies par des microtubules individuels de la fibre. Ils proposent alors que des molécules ancrées au cortex et qui sont fixes pourraient se lier aux extrémités des microtubules en croissance, et qu'un conflit entre capture et dépolymérisation pourrait générer également une traction. C'est le mécanisme de « touch and pull » (Kozlowski et al., 2007). Il existe un complexe protéique qui peut agir de la sorte sur les microtubules kinétochoriens de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Le

complexe Dam1 forme un anneau localisé aux kinétochores qui encercle l'extrémité du microtubule en dépolymérisation et retient l'interaction. Ceci génère une force de traction et permet la ségrégation des chromosomes (Gönczy, 2008). En revanche de telles molécules ne sont pas connues comme existant au cortex et comme interagissant avec les microtubules astraux. Le modèle faisant intervenir la dynéine est donc à l'heure actuelle le modèle permettant d'expliquer la régulation des forces de traction corticale. Dans les deux modèles, la dynamique des microtubules est très importante puisqu'aussi bien l'absence que la stabilisation des microtubules sont délétères pour ce mécanisme.

II.C.2. Divergences entre les complexes générateur de force de drosophile et vertébrés avec celui de *C. elegans*

Chaque complexe présenté dans les différents organismes montre des spécificités. Mais il apparaît que les complexes responsables du positionnement du fuseau chez la drosophile et les vertébrés ont plus de points communs qu'avec celui de *C. elegans*. GPR-1/2 est l'homologue de Pins chez la drosophile et de LGN chez les Vertébrés. D'un point de vue structurel, les trois protéines sont assez proches. La structure de GPR-1/2 présente une partie Nter avec deux domaines TPR (contre 7 pour Pins et LGN) et une partie Cter avec un domaine GoLoco (contre 3 pour Pins et 4 pour LGN) (Srinivasan et al., 2003). Comme pour Pins ou LGN, la partie Nter de GPR-1/2 interagit bien avec LIN-5 et le domaine GoLoco interagit avec Gα. Chez *C. elegans* aucun homologue de Insc n'a été identifié à ce jour. Chez la drosophile, la division des cellules SOP, dans lesquelles *insc* n'est pas exprimé et pour lesquelles la voie Pins/Dlg est impliquée, laisse penser que le déroulement de cette division asymétrique est plus proche de celle de l'embryon précoce de *C. elegans* par rapport à la division apico-basale du NB. De plus, si *C. elegans* n'a pas d'homologue pour Insc, il y a bien un homologue de Dlg: DLG-1. Cependant hormis son rôle dans la formation des jonctions épithéliales à des stades plus avancés, *dlg-1* ne semble pas avoir de fonction dans le positionnement du fuseau de l'embryon de *C. elegans* (Bossinger et al., 2001; Firestein and Rongo, 2001). De même dans le neuroépithélium de poulet, le recrutement latéral de LGN lors de la division planaire, bien que dépendant de Gαi, semble être dû à une exclusion du domaine apical (Hao et al., 2010; Peyre et al., 2011). Cette localisation de Gαi tout autour du cortex et l'exclusion du pôle apical de LGN/NuMA par aPKC et Par3 est plus proche en termes de localisation de ce que l'on peut retrouver dans l'embryon de *C. elegans*

contrairement à la division apico-basale. En effet chez *C. elegans*, Gα est également localisée tout autour du cortex. L'enrichissement asymétrique de GPR-1/2 en anaphase est encore mal connu mais GPR-1/2 est recrutée du côté de PAR-2.

À l'inverse, dans les divisions apico-basales de la drosophile ou des Vertébrés, Pins et LGN sont recrutées du même côté que Baz et Par3 suite au recrutement par Insc. Bien que LGN forme un complexe avec Par3 via Insc, il n'est pas clair si LGN est requis pour la localisation de Par3 et le maintien de la polarité (Izaki et al., 2006). En revanche, chez la drosophile, le rôle de Pins sur le maintien de la polarité est bien démontré et son rôle dans le positionnement du fuseau ne peut être découplé de son rôle dans la polarisation. GPR-1/2 n'affecte en aucun cas la localisation des protéines PARs ni la répartition des déterminants cellulaires ce qui facilite l'étude sur le positionnement du fuseau chez *C. elegans*. Enfin, un autre point très différent concerne la régulation intramoléculaire de Pins et LGN. Il est peu probable qu'une telle régulation existe pour *C. elegans*. Chez la drosophile et les Vertébrés, Pins et LGN possèdent plusieurs domaines GoLoco en Cter. Ainsi l'interaction d'une seule Gα avec le premier domaine GoLoco va permettre le recrutement des protéines au cortex mais les autres domaines pourront toujours maintenir les protéines dans un état « fermé » (Du and Macara, 2004; Nipper et al., 2007). GPR-1/2 n'ayant qu'un seul domaine GoLoco, le simple fait de recruter la protéine au cortex ou alors d'interagir avec LIN-5 sera suffisant pour « ouvrir » directement la protéine. De même, il est peu probable que GPR-1/2 ait la même conformation tridimensionnelle que Pins ou LGN. GPR-1/2 ne possédant que 2 domaines TPR, il est peu probable que ces domaines puissent former la même niche que les protéines LGN et Pins pour l'interaction avec Insc ou NuMA/Mud (Culurgioni et al., 2011).

La divergence existant avec les modèles drosophile et Vertébrés ainsi que l'absence d'expérience de biochimie plus poussée, font que peu de choses sont connues quant à la régulation du complexe générateur de force chez *C. elegans*. Toutefois il apparaît qu'une partie de la régulation se fasse par l'intermédiaire des protéines G hétérotrimériques.

II.C.3. Régulation des protéines G hétérotrimériques

Comme expliqué précédemment, la sous-unité Gα forme un hétérotrimère avec les sous-unités Gβγ lorsqu'elle est associée au GDP. Cependant, une fois que Gα échange son GDP en GTP, Gα se dissocie de Gβγ. Une immunoprécipitation de GOA-1 (Gα) ou de GPB-1 (Gβ) sur un extrait de vers additionné de GDP ou de GTPγS faiblement hydrolysable montre

que comme dans les autres modèles, la sous-unité G β ne s'associe à G α que lorsqu'il est sous sa forme liant le GDP. Une expérience similaire en GST-pulldown ou en Résonance à Plasmon de Surface avec GST-GPR-1 montre que GPR-1, et plus particulièrement sa partie Cter (avec le domaine GoLoco), lie également G α uniquement sous sa forme liant le GDP (Colombo et al., 2003; Gotta et al., 2003; Srinivasan et al., 2003). Ceci semble indiquer que GPR-1/2 agit comme un Guanine Dissociation Inhibitor (GDI) pour G α .

Le fait que GPR-1/2 joue un rôle de GDI et ne lie G α que sous sa conformation liant le GDP indique que d'autres protéines régulant les protéines G peuvent être importantes dans le contrôle spatial et/ou temporel du mécanisme de positionnement du fuseau. Comme par exemple des Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) ou des GTPase-Activating Protein (GAP). L'un de ces régulateurs est la protéine GEF RIC-8. Le mutant *ric-8 (md1909)* présente une faible élongation du fuseau ainsi qu'un faible déplacement postérieur, conduisant à une division symétrique comme dans les embryons déplétés pour G α . Les oscillations du fuseau en anaphase sont également absentes et la rupture du fuseau indique la perte des forces de traction. *In vitro* et *in vivo*, RIC-8 lie préférentiellement GOA-1-GDP et favorise la liaison du GTP démontrant son rôle de GEF (Afshar et al., 2004; Couwenbergs et al., 2004; Hess et al., 2004).

La plupart de ces expériences ont été réalisées avec GOA-1. Or en 2005, Afshar *et al.* montrent que malgré le fait que GOA-1 et GPA-16 interviennent dans une voie commune pour le positionnement du fuseau, ces deux G α ont chacune des spécificités vis-à-vis des différents interacteurs. De la même manière que pour GOA-1, il a été montré que GPR-1/2 et RIC-8 lient préférentiellement GPA-16-GDP. GPR-1/2 joue également un rôle de GDI envers GPA-16, cependant la fonction de GEF de RIC-8 n'est pas effective sur GPA-16 (Afshar et al., 2005). De plus, RIC-8 intervient sur la localisation et le niveau protéique de GPA-16 mais il n'affecte pas ceux de GOA-1. En conséquence, dans un double mutant *ric-8 ; gpa-16 (RNAi)* le niveau de GPR-1/2 est presque normal. Alors que dans un double mutant *ric-8 ; goa-1 (RNAi)*, l'inactivation de *ric-8* affectant en plus le niveau de *gpa-16*, ceci équivaut à un mutant *ric-8 ; goa-1 ; gpa-16 (RNAi)* et le niveau de GPR-1/2 est fortement diminué (Afshar et al., 2005). Ces données renforcent le fait que RIC-8 n'agit pas de la même manière sur GOA-1 et GPA-16. À l'inverse du modèle proposé par Srinivasan *et al.*, RIC-8 agit en amont de GPR-1/2 car son interaction avec GOA-1 ou GPA-16 n'est pas modifiée dans un contexte *gpr-*

1/2 (*RNAi*), alors que l'interaction RIC-8/ $G\alpha$ est requise pour une liaison efficace de GPR-1/2 à $G\alpha$ (Afshar et al., 2004, 2005).

Enfin, contrairement à RIC-8 qui inhibe les forces de traction des deux côtés de l'embryon, RGS-7 conduit à une hyperasymétrie des mouvements du fuseau. Ceci suite à une diminution des forces sur le pôle antérieur qui entraîne de fortes oscillations sur le postérieur mais également un déplacement postérieur plus important. La double inactivation de *rgs-7* avec *goa-1*; *gpa-16*, *lin-5* ou *gpr-1/2* inhibe ces fortes oscillations postérieures, indiquant que ces mouvements sont générés par le complexe responsable des forces de traction et que RGS-7 agit en aval de ce complexe (Hess et al., 2004). La quantification de l'hydrolyse du GTP par GOA-1 indique que RGS-7 est un GAP car il stimule l'hydrolyse.

Ainsi le modèle pourrait être le suivant (Figure 23): GOA-1 et GPA-16 sous leur forme GDP sont respectivement en complexe avec $G\beta$ et $G\gamma$. Toutefois une proportion des protéines reste libre. RIC-8 va venir interagir avec ces $G\alpha$ -GDP libres. Il va stimuler la liaison du GTP pour GOA-1 grâce son activité GEF et seulement lier la forme GPA-16-GDP (l'activité GEF ne fonctionnant pas dans le cas de GPA-16). Dans les deux, cas il semble que RIC-8 intervienne pour empêcher la reformation du complexe $G\alpha/\beta\gamma$. La protéine GAP RGS-7 permet de rétablir GOA-1 sous sa forme GDP afin qu'elle puisse interagir avec GPR-1/2 et LIN-5 et jouer son rôle dans la génération des forces de traction. GPA-16-GDP n'a pas besoin de l'intervention de RGS-7 à ce moment-là du cycle et peut directement interagir avec GPR-1/2 et LIN-5. De plus, comme GPR-1/2 coimmunoprécipite avec RIC-8, il se peut que les autres protéines du complexe soient actives même si GPA-16 lie encore RIC-8 (Afshar et al., 2004). Le retour de GPA-16 à sa forme GTP est encore mal connu. Tout comme pour GOA-1, RGS-7 qui lie préférentiellement GPA-16-GTP, peut intervenir en fin de chaîne pour que GPA-16-GDP soit de nouveau disponible pour former de nouveau un complexe avec $G\beta\gamma$ ou avec GPR-1/2 et LIN-5. Bien que la forme active de $G\alpha$ soit habituellement la forme liant le GTP dans le cas de l'activation de la signalisation $G\alpha$ par des récepteur couplés aux protéines G, il semble que dans le cas des forces de traction du fuseau ce soit la forme $G\alpha::GDP$ qui permette l'activation du complexe.

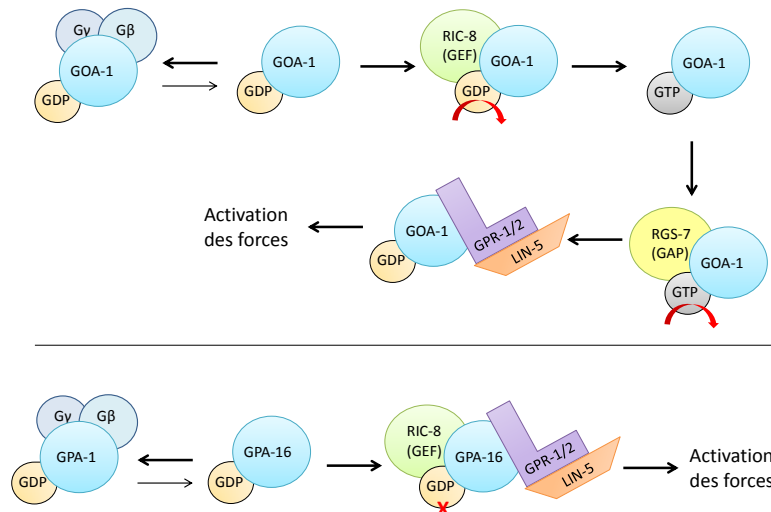


Figure 23: Modèle d'activation des Galpha dans le mécanisme de positionnement du fuseau.

GOA-1 et GPA-16 sous leur forme GDP sont respectivement en complexe avec G β et Gy.

Toutefois une proportion des protéines reste libre.

RIC-8 va venir interagir avec ces GOA-1 ou GPA-16 liant le GDP. Il va stimuler la liaison du GTP pour GOA-1 grâce son activité GEF. La protéine GAP RGS-7 permet de rétablir GOA-1 sous sa forme GDP afin qu'elle puisse interagir avec GPR-1/2 et LIN-5 et jouer son rôle dans la génération des forces de traction.

Malgré l'interaction de RIC-8 et GPA-16, l'activité GEF n'est pas effective dans le cas de GPA-16. GPA-16 liant alors toujours le GDP peut directement interagir avec GPR-1/2 et LIN-5.

II.D. Régulation spatiale et temporelle des forces de traction

Un complexe moléculaire contrôlé en amont par la polarité est donc responsable de la traction des microtubules pour positionner le NCC et le fuseau. Comment ce complexe moléculaire est-il régulé spatialement et temporellement pour permettre l'activation des forces dans différentes directions à différents moments du cycle cellulaire ? En effet, le NCC est déplacé vers l'antérieur au cours de la prophase et le fuseau vers le postérieur en anaphase. En 2004, Labbé *et al.*, utilisèrent une technique au cours de laquelle le centrosome antérieur ou postérieur est détruit par un laser. En observant les mouvements du centrosome intact, ils peuvent en déduire à quel moment les forces sont activées et dans quel sens elles sont orientées. Ils montrèrent que, lors de la centration/rotation en prophase, les forces exercées sur le centrosome antérieur sont dix fois supérieures aux forces postérieures. En revanche, en fin de prophase/prométaphase, les forces postérieures sont déjà quatre fois supérieures aux forces antérieures alors que le fuseau est central et qu'aucun déplacement n'est observé. Toujours par l'intermédiaire d'un laser, ils coupèrent les microtubules astraux positionnés entre le cortex antérieur et le centrosome en prométaphase et observèrent un déplacement postérieur du fuseau (Labbé *et al.*, 2004). Les forces de traction sont donc activées au pôle antérieur en prophase pour le déplacement du

NCC. Très rapidement elles sont activées et supérieures au pôle postérieur. Jusqu'en métaphase, des microtubules astraux retiennent le fuseau au niveau du cortex antérieur empêchant son déplacement. Puis par un signal inconnu, ce mécanisme de blocage est inactivé à l'entrée en anaphase, permettant le déplacement postérieur du fuseau. Une autre étude met en avant que la régulation temporelle des forces de traction pourrait être dépendante de la progression dans le cycle cellulaire. Par exemple, retarder l'entrée en anaphase en inactivant le protéasome ou en utilisant des mutants du complexe APC est toujours couplé d'un retard dans le déplacement postérieur du fuseau. Le complexe APC active la dégradation des cyclines B ce qui entraîne l'inactivation des kinases dépendantes des cyclines (CDK). Ainsi, à l'inverse, activer précocement l'anaphase en inhibant les CDK conduit à un déplacement précoce du fuseau (McCarthy Campbell et al., 2009). Il y a donc bien une activation des forces de traction dépendante du cycle cellulaire. Cette activation passe par la régulation de l'action des CDK. En revanche, l'initiation de l'anaphase et le déplacement du fuseau vers le postérieur sont contrôlés séparément. En effet, lors de l'inactivation des forces de traction par un RNAi de *gpr-1/2* ou *lin-5*, l'anaphase a toujours lieu indiquant que ces deux événements sont indépendants (McCarthy Campbell et al., 2009).

Il y a donc une régulation spatiale des forces antérieures et postérieures qui sont activées temporellement. Le signal permettant d'inactiver les forces de blocage mises en évidence par Labbé *et al* est encore inconnu. On sait cependant que LIN-5 est phosphorylée par PKC-3 à l'antérieur pendant la mitose. La perte de cette phosphorylation conduit à un déplacement antérieur du fuseau indiquant qu'elle permet l'inhibition des forces de traction dirigées vers l'antérieur (Galli et al., 2011). GPR-1/2 étant dépendante de LIN-5 pour sa localisation, il se pourrait que leur interaction ne soit plus possible à l'antérieur lorsque LIN-5 est phosphorylée, entraînant alors son enrichissement au postérieur permettant le déplacement du fuseau en anaphase. Il se pourrait que la transition dans les forces appliquées sur le fuseau, observée par Labbé *et al*, conduise à la phosphorylation de LIN-5 par PKC-3.

II.D.1. Positionnement central du complexe Noyaux/Centrosomes (NCC)

Labbé *et al.* ont donc mis en évidence la présence d'une force de traction en direction du pôle antérieur en prophase. De plus, ceci corrèle avec la localisation de GPR-1/2 et LIN-5. Peut-on alors expliquer les mouvements de centration/rotation du NCC ?

En 1998, Reinsch et Gönczy décrivent deux mécanismes pouvant expliquer les mouvements des pronoyaux lorsque ceux-ci sont associés aux centrosomes. Les deux font intervenir les microtubules. Le premier mécanisme de centration s'explique par une force de propulsion exercée par la polymérisation des microtubules contre la membrane cellulaire. Cette force de propulsion va repousser le NCC au centre de la cellule (Reinsch and Gönczy, 1998). Cette position pourra être maintenue par le fait que des forces égales générées tout autour du cortex s'opposeront (Figure 24).

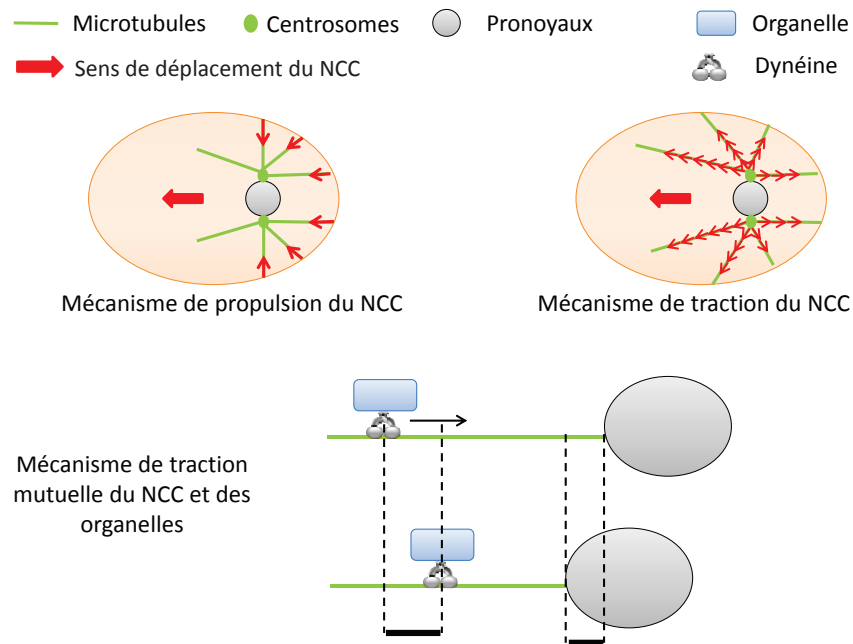


Figure 24: Modèles de positionnement du complexe Noyau/Centrosome (NCC) lors de la prophase.

Mécanisme de propulsion: la polymérisation des microtubules contre la membrane cellulaire va générer une force contraire. Cette force de propulsion va repousser le NCC au centre de la cellule. Cette position pourra être maintenue par le fait que des forces égales générées tout autour du cortex s'opposeront.

Mécanisme de traction: Des moteurs dirigés vers l'extrémité "+" des microtubules sont ancrés le long des microtubules et distribués dans le cytoplasme. Les centrosomes vont alors être tractés en fonction de la force exercée par les moteurs sur chacun des microtubules. Les microtubules les plus longs pouvant fixer un plus grand nombre de moteurs il en résulte un déplacement global en direction des microtubules les plus longs qui sont dirigés vers l'antérieur de la cellule. Une fois le NCC au centre, des forces égales vont s'opposer ce qui permet le maintien de cette position.

Mécanisme de traction mutuelle: Le transport des organelles par la dynéine le long des microtubules génère une force de traction sur les noyaux qui vont alors se diriger vers le centre. Cette force est également proportionnelle à la longueur des microtubules.

(Schéma adapté de Kimura et Onami 2005 et Kimura et Kimura 2010)

Une simulation physique du déplacement des noyaux dans un embryon de Xénope a révélé que la quantité de microtubules nécessaires pour que la force de propulsion puisse à elle seule générer le déplacement du NCC est aberrante. Ceci indique qu'une autre force doit être impliquée. Cette autre force est une force de traction le long des microtubules. Des moteurs dirigés vers l'extrémité "-" des microtubules sont ancrés le long des microtubules et sont même distribués dans le cytoplasme. Les centrosomes vont alors être tractés en fonction de la force exercée par les moteurs sur chacun des microtubules. Les microtubules les plus longs pouvant fixer un plus grand nombre de moteurs, il en résulte un déplacement global en direction des microtubules les plus longs. Une asymétrie au niveau des asters est essentielle dans ce processus pour initier le déplacement vers le centre de la cellule. En effet, au début de la centration, le NCC étant postérieur, les microtubules les plus longs sont dirigés vers le cortex antérieur impliquant qu'il y a plus de force pour le déplacement du NCC vers l'antérieur. Une fois au centre, les forces se stabilisent comme dans le mécanisme de propulsion (Reinsch and Gönczy, 1998)(Figure 24). En 2005, Kimura *et al* démontrent, par la modélisation de la courbe de déplacement des pronoyaux, que le mécanisme qui prime lors de la centration/rotation est celui de la traction des microtubules à travers le cytoplasme. Tout comme dans le modèle de Reinsch et Gönczy, la force générée est proportionnelle à la taille du microtubule : plus le microtubule est long, plus la force totale de traction est importante car un plus grand nombre de moteurs peuvent se fixer. De plus, cette traction est dépendante de la dynéine (Kimura and Onami, 2005). Par la suite, ils émettent l'hypothèse que la centration se fait grâce au trafic intracellulaire des organelles sur lesquels se fixe la dynéine. Ceci corrèle avec leur modèle de 2005, la force générée étant alors proportionnelle à la longueur des microtubules. Le transport des organelles par la dynéine le long des microtubules génère une force de traction sur les noyaux qui vont alors se diriger vers le centre (Figure 24). Affecter ce trafic, en inactivant par exemple *rilp-1* (protéine requise pour le transport des lysosomes), affecte en contrepartie la centration (Kimura and Kimura, 2010). Dans un crible phénotypique recherchant les mutations qui affectent la centration, sans affecter les autres mouvements des pronoyaux comme la migration, ils identifient la sous-unité de la dynéine DYRB-1. L'ancrage de DYRB-1 aux organelles est indépendant du complexe ternaire Gα/GPR/LIN-5. De plus, une lignée GFP::DYRB-1 décrit un pattern filamenteux qui corrèle avec les microtubules astraux. Certains points se déplacent en

direction du centrosome et ces déplacements sont dépendants de la dynéine. Ceci est cohérent avec le fait que plusieurs moteurs peuvent se fixer sur un seul microtubule (Kimura and Kimura, 2010). Ensuite, Gusnowski et Srayko mirent au point une expérience permettant de mesurer (indirectement) l'activité de la dynéine sur un microtubule. Grâce à une lignée GFP ::EBP-2 marquant l'extrémité d'un microtubule en croissance, ils déterminent la vitesse de base de déplacement de ces foci d'EBP-2 au cortex. Lorsqu'un microtubule est pris en charge par la dynéine, la vitesse est alors modifiée et on peut en déduire celle inhérente à la dynéine même. En mesurant ces activités, ils se sont aperçus que certains microtubules qui se retrouvent presque parallèles au cortex ne dépolymérisent pas. Ils persistent et peuvent même glisser le long du cortex. Ce glissement est dépendant de la dynéine et de la dynactine mais aussi de LIN-5. En revanche, les autres protéines du complexe ternaire sont dispensables. Enfin, ils montrent que ces mouvements de glissement sont plus fréquents avant la métaphase c'est-à-dire pendant la centration/rotation (Gusnowski and Srayko, 2011). Ils en concluent que du fait de la position des centrosomes en prophase et en anaphase, les microtubules arrivent avec un angle différent au niveau du cortex. Le complexe avec lequel le microtubule va interagir sera dépendant de cet angle. Si l'angle est faible et que le microtubule est presque parallèle au cortex, il sera pris en charge par la dynéine corticale indépendante du complexe ternaire (mais toujours dépendante de LIN-5). En revanche, si le microtubule arrive perpendiculairement au cortex, il sera pris en charge par la dynéine corticale liée au complexe ternaire (Figure 25). Ainsi, le cas où les microtubules sont parallèles au cortex prédomine en prophase alors que le cas où les microtubules sont perpendiculaires au cortex prédomine en anaphase (Gusnowski and Srayko, 2011). Cette étude est confortée par le fait que deux groupes ont remarqué la présence de deux pools distincts de LIN-5 : un dont la localisation corticale est dépendante de $G\alpha$ et GPR-1/2 et un autre dont la localisation est indépendante (Park and Rose, 2008; Srinivasan et al., 2003). Ainsi il semble que la centration/rotation implique dans une moindre mesure le complexe ternaire chez *C. elegans* malgré un enrichissement des protéines au cortex antérieur en prophase.

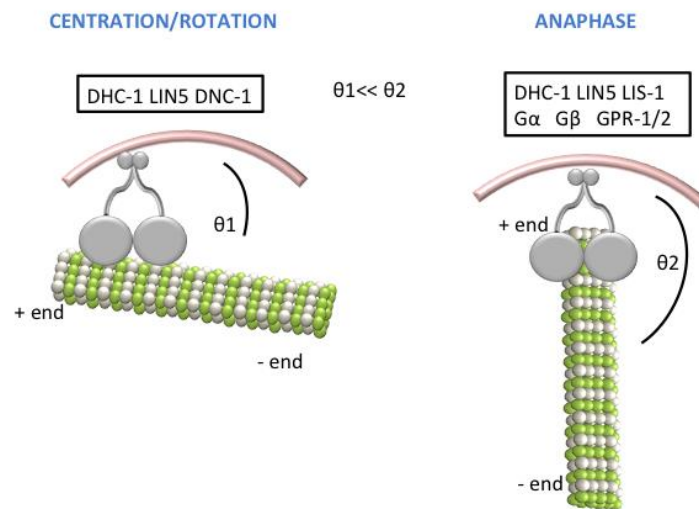


Figure 25 : Modèle proposé par Gusnowski et Srayko pour le positionnement du noyau et du fuseau.

En prophase et en anaphase, les microtubules arrivent avec un angle différent au niveau du cortex (en rose). Le complexe avec lequel le microtubule va interagir sera dépendant de cet angle. Si l'angle est faible et que le microtubule est environ parallèle au cortex il sera pris en charge par la dynéine corticale indépendante du complexe ternaire. En revanche si le microtubule arrive perpendiculairement au cortex il sera pris en charge par la dynéine corticale liée au complexe ternaire. Ainsi le cas où les microtubules sont parallèles au cortex prédomine en prophase alors que le cas où les microtubules sont perpendiculaires au cortex prédomine en anaphase.

La dynéine est représentée en grise. (Adapté de Gusnowski et Srayko, 2011)

II.D.2. Positionnement postérieur du fuseau mitotique

Nous avons vu que l'activation des forces est temporelle et qu'elle corrèle avec la localisation asymétrique des protéines GPR-1/2 et LIN-5, bien qu'il semble que LIN-5 soit plus important dans la centration que GPR-1/2. Beaucoup d'études se sont alors intéressées à la répartition des générateurs de force (FGs) en anaphase.

En 2003, Grill *et al.*, réalisent une expérience pour obtenir un ordre de grandeur du nombre de FGs autour du cortex (Grill *et al.*, 2003). Avec un laser, ils détruisent le centrosome dans une lignée exprimant la GFP couplée à la tubuline α . Cette technique est appelée OICD pour Optical Induced Centrosome Destruction. Si l'ablation est partielle, ceci conduit à la fragmentation de l'aster. Chaque fragment est tiré dans une direction spécifique vers le cortex. En supposant qu'un fragment soit lié à un microtubule tiré par un FG, le déplacement d'un fragment individuel à une vitesse donnée reflète la localisation d'un FG au cortex. Ainsi, le suivi des fragments permet de comptabiliser le nombre de FGs à un temps donné, mais aussi de les localiser tout autour du cortex. Les résultats révèlent qu'il y a un nombre fixe et limité (une centaine) de FGs activés à un temps donné, suggérant que seuls

quelques microtubules participent à la force de traction. Ils constatent ensuite que la vitesse de chacun de ces fragments est la même, qu'ils soient dans la partie antérieure ou postérieure de la cellule. Ceci démontre que chaque FG tire avec la même intensité sur le microtubule. Ainsi, les auteurs proposent à l'aide d'un modèle physique, que l'asymétrie des forces de traction dans l'embryon de *C. elegans* est due à la présence de 50% de plus de FGs au cortex postérieur par rapport au cortex antérieur. Parmi toutes les molécules du complexe, seules GPR-1/2 et LIN-5 semblent avoir une localisation asymétrique et dynamique en fonction de l'avancement de la mitose (Park and Rose, 2008). Ainsi, la localisation de ces protéines pourrait refléter l'asymétrie dans la répartition des FGs.

Une autre étude renforce la théorie de l'asymétrie dans le nombre des FGs. En fragilisant le réseau d'actomyosine par inactivation partielle de la myosine non-musculaire *nmy-2*, Redemann *et al.* observent des invaginations de la membrane plasmique en direction des pôles du fuseau. Ils font l'hypothèse que ces invaginations pourraient correspondre à des FGs individuels et qu'elles seraient dues à la traction des microtubules sur la membrane. Bien qu'il n'y ait pas d'évidence directe en microscopie de microtubules reliés à ces invaginations, la dépolymérisation des microtubules par le nocodazole entraîne leur perte. Ils démontrent qu'elles sont dépendantes des protéines du complexe ternaire $G\alpha$ /GPR-1/2/LIN5 et de la dynéine, que leur nombre est dépendant de la polarité et du stade du cycle cellulaire (Redemann *et al.*, 2010). Aussi, dans un contexte sauvage, ces invaginations sont limitées et sont plus nombreuses du côté postérieur de la cellule ce qui va dans le sens de l'étude de Grill *et al.*

Il y a donc une répartition asymétrique dans la répartition des FGs. Cependant, nous avons vu que lors du positionnement des noyaux les FGs pourraient être majoritairement cytoplasmiques alors que lors du positionnement du fuseau ils seraient majoritairement corticaux. Pour comprendre comment la transition se fait entre le positionnement des noyaux puis celle du fuseau, Kimura et Onami ont étudié la distribution spatiale des forces en mesurant les mouvements (à l'échelle du micromètre) effectués par les centrosomes grâce à une analyse d'image. Labbé *et al.* ont déjà montré que les forces de traction dirigées vers le postérieur sont activées tôt dans le cycle cellulaire. Mais elles sont contrebalancées par l'attachement des microtubules astraux à l'antérieur expliquant le maintien de la centration avant le déplacement postérieur du fuseau. Dans un embryon sauvage, les

« micromouvements » des centrosomes sont dirigés vers le postérieur au cours de la division. Dans un contexte *dhc-1 (RNAi)*, ces micromouvements sont fortement réduits indiquant qu'ils sont bien dépendants des forces liées aux microtubules. Enfin, lorsque les gènes impliqués dans le complexe ternaire sont inactivés, ces mouvements sont dirigés vers le centre de la cellule. Ceci confirme les données de Labbé *et al.* : les forces corticales postérieures sont déjà actives pendant l'établissement de la centration et s'opposent aux forces dirigées vers le centre de la cellule. Ils mettent ensuite en place le calcul d'un « index postérieur » qui prend en compte l'angle de la direction du micromouvement par rapport au cortex, la vitesse de déplacement et la fréquence des micromouvements dans une direction spécifique. Cet index va permettre de comprendre la distribution des forces de traction autour du cortex aussi bien pendant la centration que pendant le déplacement postérieur. Ainsi ils montrent que lors de la phase de centration, les forces dirigées vers l'antérieur sont plus fortes et, plus important, les forces latérales postérieures sont réprimées par rapport aux forces latérales antérieures. En revanche lors de la phase de déplacement du fuseau, les forces latérales postérieures sont restaurées et redeviennent plus fortes que les forces antérieures (Kimura and Onami, 2007).

Une protéine qui est localisée au niveau latéral du cortex postérieur peut expliquer cette répression des forces. Il s'agit de LET-99. C'est une protéine à domaine DEP (Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin domain) qui se localise en une bande latérale au niveau du cortex postérieur. Cette localisation atypique est due à la restriction de LET-99 par PAR-3 du côté antérieur, et par la restriction par PAR-1 du côté postérieur (Tsou et al., 2002; Wu and Rose, 2007) (Figure 26). De plus, elle coïncide avec le pattern bipolaire de GPR-1/2. LET-99 régule en fait la localisation corticale de GPR-1/2 en repoussant la protéine au niveau de la partie la plus postérieure du cortex (Tsou et al., 2003). L'inactivation de *let-99* entraîne de fortes oscillations des pronoyaux pendant la phase de centration/rotation et joue un rôle dans l'asymétrie des mouvements du fuseau en anaphase. Ces phénotypes sont dus à la relocalisation de GPR-1/2 autour du cortex qui perd son pattern bipolaire (Tsou et al., 2002, 2003; Wu and Rose, 2007). Le fait que LET-99 repousse GPR-1/2 dans la partie la plus postérieure du cortex modifie la répartition des forces de traction. Ainsi l'inhibition latérale des forces est à l'origine de la formation de trois domaines de force distincts plutôt que de deux (antérieur vs postérieur). La distribution des forces présentée dans le modèle de

Kimura et Onami en 2007 est alors confirmée par une nouvelle expérience d'OICD. Dans un embryon sauvage, la vitesse de déplacement des fragments du centrosome antérieur est plus faible que celle des fragments du centrosome postérieur. Mais plus important encore, la vitesse de déplacement des fragments qui sont dirigés vers les cortex latéraux est encore plus faible que celle des fragments dirigés vers l'antérieur. Il y a donc bien trois domaines de force, un antérieur, un postérieur et un dernier latéral (Figure 26) (Krueger et al., 2010). En l'absence de *let-99*, GPR-1/2 est localisée uniformément autour du cortex. En conséquence les vitesses de déplacement des fragments de centrosomes sont égales dans toutes les directions. Cette répression latérale permettrait la concentration des forces au point le plus postérieur du cortex augmentant ainsi la force nette exercée dans cette direction. Il en résulte le déplacement asymétrique postérieur du fuseau (Krueger et al., 2010). LET-99 est donc le meilleur candidat pour expliquer les différents domaines et la répression latérale des forces et ce modèle explique très bien le déplacement postérieur du fuseau. Cependant, Kimura et Onami suggéraient que la mise en place de cette répression permettait la centration/rotation du NCC mais que, lors du déplacement postérieur, la répression était ensuite levée. Il semble plutôt que la répression soit maintenue tout au long de la division, et le mécanisme qui permet de passer de la centration au déplacement postérieur reste encore inconnu. De plus, bien que le pattern bipolaire de GPR-1/2 soit expliqué par LET-99, on ne sait pas d'un point de vue moléculaire ce qui entraîne cette restriction.



Figure 26: Localisation de LET-99 et définition des trois domaines de force.

LET-99 est restreint par PAR-3 du côté antérieur, et par PAR-1 du côté postérieur. Elle se localise donc en une bande latérale au niveau du cortex postérieur. LET-99 exclut GPR-1/2 de cette bande corticale ce qui restreint GPR-1/2 à la partie la plus postérieure. Ces localisations vont définir alors 3 domaines pour les forces corticales:

- 1 domaine postérieur ou les forces sont fortes et qui est enrichi pour GPR.
- 1domaine antérieur ou les forces sont faibles ou GPR n'est pas enrichi.
- 1domaine latéral ou les forces sont inhibée et où GPR est exclu.

(Schéma extrait de Krueger *et al.*, 2010)

II.D.3. Oscillations des pôles du fuseau : force de traction vs force de propulsion

La localisation asymétrique des FGs peut expliquer le déplacement postérieur du fuseau en anaphase le long de l'axe antéro-postérieur. Mais comment expliquer mécaniquement les oscillations transverses du fuseau ? Il est pourtant évident que les protéines qui composent ce complexe sont également responsables des oscillations étant donné que leur inactivation conduit à un arrêt des oscillations. Mais on ne sait pas si une régulation par d'autres molécules est nécessaire, activant ou désactivant les moteurs d'un côté ou de l'autre par exemple. Ou encore si ce sont des propriétés différentes des FGs qui sont impliquées ?

En 2006, un modèle physique a été proposé impliquant la dynamique des microtubules. Pour produire ces oscillations, il faut une coordination mécanique entre les moteurs et une autre force qui doit s'opposer aux forces de traction. Quand les microtubules astraux polymérisent du centrosome vers le cortex, leur contact produit une force de propulsion qui a tendance à centrer le fuseau dans la cellule comme proposé déjà par Reinsch et Gönczy (Reinsch and Gönczy, 1998). Cette force de propulsion est appelée "force de centrage" (Pecreaux et al., 2006). Le fait que le nombre de FGs autour du cortex soit faible par rapport au nombre de microtubules qui polymérisent (100 contre 1000 microtubules astraux environ) corrèle avec la possibilité de cette force de centrage (Grill et al., 2001). Enfin, cette force de centrage est également proposée par Kozłowski *et al.* qui montrent que certaines fibres de microtubules persistent au cortex lors des oscillations (Kozłowski et al., 2007). Le principe des oscillations est le suivant : en anaphase un FG est activé aléatoirement et tire sur un microtubule. À cause de la force de centrage, le fuseau a tendance à retourner au centre. Lors de son retour en position d'équilibre il acquiert une vitesse plus importante et dépasse sa position d'équilibre. La vitesse que le centrosome accumule lors de son retour à l'équilibre l'entraîne donc vers la direction opposée. De plus, les auteurs suggèrent que l'activité des moteurs augmente au cours du temps. Ainsi, alors que le centrosome retourne au centre, il va pouvoir être tiré de nouveau mais du côté opposé de la cellule par un autre moteur car les contacts microtubules/cortex sont favorisés de ce côté. Puis de nouveau la force de centrage le repoussera vers le centre et ainsi de suite (Figure 27). Les oscillations seraient donc le résultat d'une compétition entre la force de

centrage et le phénomène lié à l'activation graduelle des FGs qui est "la processivité des moteurs moléculaires" (Pecreaux et al., 2006).

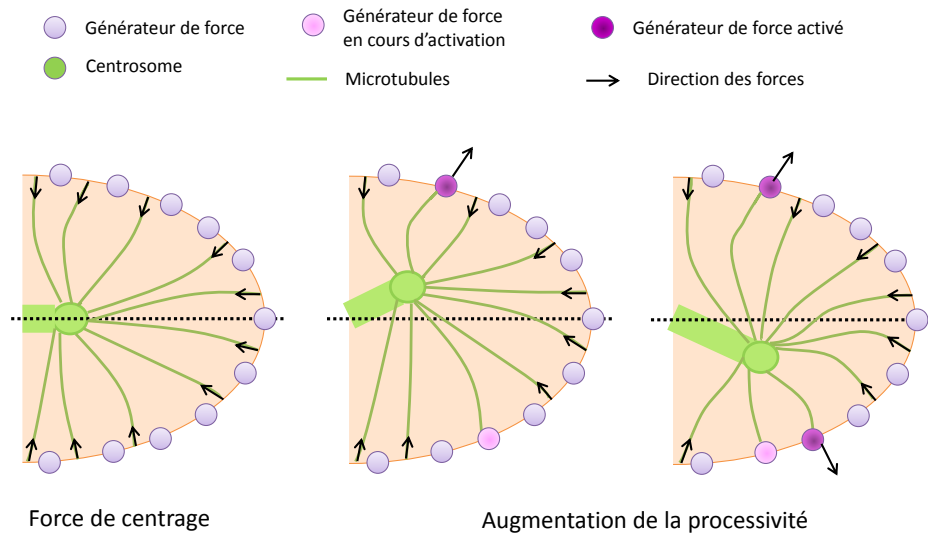


Figure 27: Modèle d'initiation des oscillations du fuseau mitotique chez *C. elegans*.

Une force de centrage exercée par la polymérisation des microtubules contre le cortex va positionner le centrosome (et donc le fuseau) au centre.

Un moteur va être activé et va tracter un microtubule ce qui va entraîner le centrosome dans cette direction.

Du fait de la force de centrage le centrosome va avoir tendance à se repositionner au centre.

Lors de son retour à sa position d'équilibre, le centrosome acquiert une vitesse qu'il l'entraîne en direction du cortex opposé. D'autres moteurs activés pourront alors capturer des microtubules et tracté le centrosome.

L'activation temporelle des moteurs ainsi que la force de centrage seraient donc responsables des oscillations du fuseau.

L'activation graduelle des moteurs explique également pourquoi les oscillations augmentent au cours du temps. Cependant pour que les oscillations durent un certain temps il est important qu'il y ait un mécanisme d'auto-entraînement. Ce mécanisme explique que même une faible fluctuation entrainera de fortes oscillations et non le retour immédiat à un état d'équilibre. Ce mécanisme d'auto-entraînement consiste en le fait que lorsqu'un FG tire un microtubule, plus la longueur du microtubule à tirer est faible (donc plus le centrosome est proche du cortex), plus le microtubule est tiré efficacement en comparaison à un moteur opposé qui tracte le centrosome à partir d'un long microtubule. Et ceci même si la force avec laquelle les deux FGs opposés tirent le microtubule est identique. D'où la nécessité d'une force de centrage qui s'opposera à cette traction et permettra le retour du centrosome du côté opposé (Figure 28). Pour l'équipe de François Nédélec, ce phénomène d'auto-entraînement ne s'explique pas par l'efficacité avec laquelle un FG va tracter le microtubule.

Elle s'explique plutôt par le fait que plus le centrosome est proche du cortex, et plus d'autres moteurs vont pouvoir capturer des microtubules, en opposition avec le côté opposé qui aura perdu ses contacts microtubules/FGs à cause de la trop grande distance (Figure 28) (Kozlowski et al., 2007).

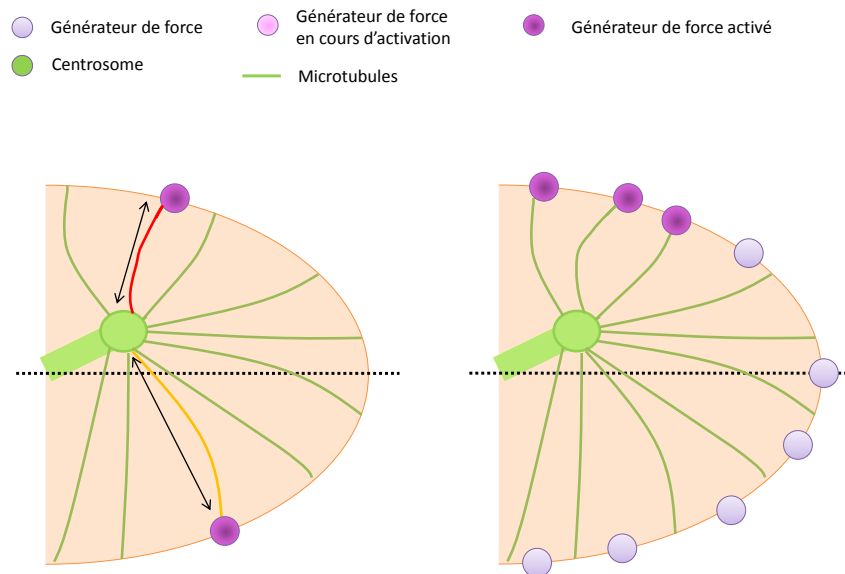


Figure 28: Mécanisme d'autoentraînement des oscillations.

Selon Pécrcéaux *et al*, lorsqu'un FG tire un microtubule, plus la longueur du microtubule à tirer est faible, plus le microtubule est tiré efficacement en comparaison à un moteur opposé qui tracte le centrosome à partir d'un long microtubule (les deux moteurs tractant les microtubules avec la même force).

Selon Kozlowski *et al*, plus le centrosome est proche du cortex et plus d'autres moteurs vont pouvoir capturer des microtubules en opposition avec le côté opposé qui aura perdu ses contacts microtubules/FGs à cause de la trop grande distance.

Ainsi, prenant en compte force de centrage et processivité, Pécrcéaux *et al*. proposent un modèle physique pour expliquer en même temps l'élongation, le déplacement postérieur et les oscillations du fuseau dans l'embryon précoce de *C. elegans*. Quand la processivité atteint un seuil (par une augmentation du nombre de moteurs activés ou par une augmentation de l'activité individuelle des moteurs), l'oscillation commence. Suite à l'auto-entraînement et à l'augmentation graduelle de la processivité au cours du temps, les oscillations vont augmenter en amplitude. Une fois que la processivité atteint un plateau, cela correspond à un état d'équilibre où tous les moteurs sont activés. Ceci mène à l'amortissement des forces car il n'y a plus d'asymétrie et ceci se traduit par l'arrêt des oscillations. Ce seuil se vérifie avec l'inactivation partielle de *gpr-1/2*. Après 3 heures

d'inactivation de *gpr-1/2* par RNAi, correspondant à 75% des protéines GPR-1/2 totales restantes, les oscillations et le déplacement postérieur sont toujours présents. Après 11 heures d'inactivation, correspondant à 50% des protéines totales restantes, seules les oscillations sont affectées et après 35 heures, correspondant à une inactivation totale de la protéine, les oscillations et le déplacement postérieur sont absents. Ainsi lorsqu'il reste encore 50% des protéines, les oscillations sont fortement diminuées voire même arrêtées. Ceci suggère qu'elles sont dépendantes du nombre et/ou de l'activité des moteurs et qu'une quantité minimale est indispensable au démarrage des oscillations. De plus, il est observé que le démarrage des oscillations se fait en décalage par rapport au moment où le fuseau commence son déplacement vers le côté postérieur. Cette observation est en concordance avec les résultats trouvés lors de l'inactivation partielle de *gpr-1/2* et la présence d'un seuil pour le démarrage des oscillations. L'activation d'un nombre plus faible de moteur est suffisante pour le déplacement postérieur mais l'activation d'un plus grand nombre est requise pour commencer à osciller. Enfin, il faut souligner que dans ce modèle, la courbe de processivité des moteurs est proportionnelle au cours du temps à la courbe du déplacement du pôle postérieur du fuseau selon l'axe antéro-postérieur (Pécraux *et al.*, 2006). Ainsi, le modèle prédit que l'analyse de la courbe de déplacement du centrosome postérieur reflète l'activation temporelle des moteurs.

Pour conclure, alors que les oscillations du fuseau ne sont pas essentielles au bon déroulement des divisions embryonnaires chez *C. elegans*, leur analyse a permis de mieux comprendre la régulation spatio-temporelle des forces mécaniques agissant sur le fuseau mitotique.

II.D.4. Conclusion

Le positionnement du fuseau est dû principalement à la traction des microtubules grâce à un complexe ancré au cortex composé de $G\alpha$ /GPR-1/2/LIN-5/dynéine. Toutefois, les expériences d'ablation laser du fuseau permettant de révéler ces forces ne permettent pas de mettre en évidence d'éventuelles autres forces mécaniques exercées sur le fuseau (Grill *et al.*, 2001). C'est le cas par exemple des forces de centrage exercées par les microtubules, qui ont été révélées par l'analyse précise du mécanisme des oscillations transverses et leur modélisation. En l'absence du complexe générateur de force, certains mouvements du fuseau mitotique persistent, suggérant que des forces mécaniques indépendantes des forces

de traction participent à la dynamique du fuseau. Par exemple, en l'absence de *gpr-1/2*, et plus particulièrement *lin-5*, on observe un léger déplacement du fuseau vers l'antérieur en mitose. En conséquence la division n'est plus symétrique mais asymétrique en taille avec une petite cellule AB antérieure et une grosse cellule P1 postérieure. Ainsi, il existe une force indépendante des forces de traction, dirigée vers l'antérieur. Il pourrait s'agir par exemple d'une force de centrage qui est plus importante au cortex postérieur qu'au cortex antérieur. Cependant, l'implication des forces de centrage n'a pas été systématiquement étudiée. Après inactivation de *gpr-1/2* ou *lin-5*, on observe également que le fuseau est toujours capable de s'allonger, bien que de manière plus restreinte que dans un embryon sauvage. Ceci suggère que l'élongation du fuseau peut se faire en partie indépendamment des forces de traction corticales. Une étudiante en thèse de l'équipe a pu démontrer qu'il existait en effet une force de propulsion générée par le fuseau central lui-même, indépendamment des centrosomes et indépendamment de l'activité des microtubules kinétochoriens pour séparer les chromosomes (Nahaboo et al., 2015).

Ainsi, au-delà des forces de traction corticales, d'autres forces mécaniques interviennent dans la dynamique du fuseau mitotique. Même si les bases moléculaires de ces différentes forces ne sont pas identifiées, l'analyse des mouvements observés des pronoyaux et du fuseau mitotique permet d'explorer la balance des forces. Nous avons choisi d'étudier en détails ces mouvements dans différentes espèces de nématodes, présentant différentes dynamiques du fuseau et des noyaux en prophase. Nous espérons ainsi pouvoir dégager des règles générales sur la mécanique du fuseau par l'approche comparative, et également comprendre si la balance des forces a pu évoluer entre espèces, tout en maintenant un positionnement asymétrique du fuseau mitotique.

III. Conservation de la division asymétrique chez les Nématodes

III.A. Études développementales par analyses comparatives

Il existe une grande conservation des fonctions des molécules au cours de l'évolution. Nous avons vu précédemment l'exemple des protéines du complexe ternaire que l'on retrouve dans des organismes très différents pour l'accomplissement d'une même fonction. Nous avons vu cependant, qu'entre ces espèces, des différences existaient dans les régulations précises de ces molécules. En effet, lorsqu'un système biologique est soumis à

forte pression de sélection pour le maintien d'une fonction, une dérive des mécanismes sous-jacents peut se produire sans que la fonction ne soit altérée. C'est ce qu'on appelle la Dérive des Systèmes Développementaux (DSD) (Haag, 2014). Une évolution cryptique des mécanismes (et donc des molécules impliquées) est donc possible. Par exemple, chez la drosophile, les divisions apico-basales et antéro-postérieures requièrent des protéines comme Insc ou Dlg pour la localisation de Pins. Malgré la conservation de la fonction du complexe impliqué dans le positionnement du fuseau, chez *C. elegans* un mécanisme différent est employé pour la localisation de GPR-1/2. Comprendre la diversité des fonctions moléculaires et des mécanismes sous-jacents d'une fonction très conservée reste donc un enjeu pour comprendre la diversité du vivant. Pour évaluer cette évolution cryptique, il est nécessaire cependant de comparer des organismes phylogénétiquement proches, pour s'affranchir de différences dues à des histoires évolutives trop divergentes.

La discipline s'intéressant à l'évolution des processus développementaux ou cellulaires (comme l'Evo/Devo) s'est principalement concentrée sur des questions ayant trait à des changements phénotypiques entre espèces. Par exemple, quels mécanismes moléculaires ou physiques permettent les changements de formes ou de couleurs entre espèces (Beldade and Brakefield, 2002; Klingenberg, 2010). Ce n'est que plus récemment que des travaux s'intéressant à la variation cryptique dans des processus développementaux ou cellulaires très conservés ont émergé. Par exemple, les orthologues de plus de 1300 gènes ayant un phénotype visible chez *C. elegans* ont été inactivés dans le nématode *C. briggsae* (Verster et al., 2014, voir § III.B.2). Alors que l'on s'attend à ce que l'inactivation d'orthologues produise des phénotypes similaires, 91 gènes présentent un phénotype différent entre *C. elegans* et *C. briggsae*. Cette étude a mis en avant que les facteurs de transcription restreints au phylum des nématodes étaient très souvent touchés par le phénomène de DSD. Aussi, un gène qui est apparu récemment d'un point de vue phylogénétique sera également plus souvent concerné. En revanche, des gènes intervenant par exemple dans la synthèse protéique, qui est un mécanisme cellulaire de base très conservé, divergent très peu (Verster et al., 2014).

À une échelle très différente, les lignages embryonnaires et/ou postembryonnaires de plusieurs espèces de nématode ont été réalisés (Sternberg and Horvitz, 1982; Wiegner and Schierenberg, 1998; Zhao et al., 2008). Alors que la morphologie des embryons, des

larves et des adultes est extrêmement similaire entre espèces, les schémas de division permettant la formation des cellules précurseurs de l'intestin ou de la lignée germinale peuvent être différents. Ceci peut changer la position des cellules au sein de l'embryon. Ainsi des interactions cellule/cellule essentielles pour la différenciation d'une cellule dans une espèce peuvent être dispensables dans une autre (Goldstein, 2001; Schierenberg, 2001). Toutefois il y aura toujours une cellule précurseur pour la formation de tissu spécifique dans chaque espèce. D'autres études se sont concentrées sur l'évolution du développement de la vulve des nématodes : organe de ponte et de reproduction. Le lignage de la vulve est simple et fait intervenir seulement trois cellules épithéliales précurseurs qui vont se diviser et se différencier en cellules vulvaires dans toutes les espèces. Cette différenciation fait intervenir des signalisations entre cellules, et la nature moléculaire des signaux et des voies de transduction du signal a été très étudiée dans l'espèce *C. elegans*. Dans d'autres espèces, différents types d'interactions cellulaires et différentes régulations des voies moléculaires conduisent toutes à la formation d'une vulve fonctionnelle. Ainsi, au cours de l'évolution des nématodes, différentes stratégies développementales ont été adoptées pour former un même organe (Félix et al., 2000; Kiontke et al., 2007).

À l'échelle cellulaire, Goldstein *et al.* analysent en 1998 la première division embryonnaire dans une trentaine d'espèces de nématodes appartenant ou non au même clade que *C. elegans*. Dans toutes les espèces, l'embryon est polarisé et la division est asymétrique comme chez *C. elegans*. Nous avons vu chez *C. elegans* que le signal de polarisation se faisait par l'intermédiaire du centrosome spermatique. Or, certaines de ces espèces sont parthénogénétiques et ne subissent donc pas de fécondation. Dans d'autres espèces à développement classique (male/femelle), la position du pôle postérieur ne corrèle en rien avec celle du spermatozoïde, contrairement à *C. elegans* (Goldstein et al., 1998). Ces travaux montrent que bien que la polarité cellulaire soit très conservée entre espèces, le spermatozoïde n'est pas toujours l'élément initiateur de cette polarité et que différents mécanismes permettant la polarisation ont dû émerger au cours de l'évolution.

Une autre étude qui s'est intéressée à un mécanisme cellulaire a été réalisée chez le Xénope. L'équipe de Rebecca Heald a cherché à comprendre comment la taille du fuseau méiotique était régulée afin d'assurer le maintien d'une structure bipolaire robuste. En comparant deux espèces de Xénope, *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis* qui présentent des

tailles de fuseau très différentes, cette équipe a mis en avant qu'une protéine était régulée différenciellement entre ces deux espèces : la katanin. Cette protéine a la capacité de couper les microtubules. Chez *X. laevis*, la sous-unité catalytique de cette protéine est phosphorylée ce qui l'inhibe et favorise la formation d'un long fuseau. En revanche, chez *X. tropicalis*, cette protéine ne possède pas le site de phosphorylation responsable de l'inhibition de la protéine. Elle est donc active lors de l'élongation du fuseau et favorise la formation d'un fuseau court. Ainsi, une différence évolutive dans la régulation de la katanin conduit à des tailles différentes de fuseau entre espèces. Pourtant, chacune des espèces possède un fuseau bipolaire fonctionnel permettant la bonne ségrégation des chromosomes (Loughlin et al., 2011).

III.B. Le positionnement du fuseau chez les Nématodes

III.B.1. Les Nématodes, modèles d'étude pour la première division de l'embryon

Nous avons vu que la première division embryonnaire est asymétrique dans de nombreuses espèces de nématodes, donnant naissance à une petite cellule postérieure, précurseur de la lignée germinale. Ainsi, bien que le processus de polarisation de la cellule ait changé, le processus de déplacement asymétrique du fuseau mitotique est très conservé dans ces espèces éloignées parfois de plusieurs centaines de millions d'années (Dolinski et al., 2001; Goldstein et al., 1998). Nous avons cherché à savoir si ce processus reposait sur un mécanisme sous-jacent très conservé, ou au contraire différent en fonction des espèces. Par exemple, les mêmes forces mécaniques sont-elles impliquées dans le positionnement du fuseau ? Existe-t-il différents modes de régulation des protéines impliquées dans les forces de traction entre espèces proches de nématodes ? Ou bien ne trouve-t-on que des différences aussi importantes que lorsque l'on compare des organismes très divergents comme *C. elegans* et la drosophile ?

Nous avons vu que le mécanisme de positionnement du fuseau mitotique est très bien décrit dans l'espèce *C. elegans* et servira donc de référence pour une approche comparative. De nombreuses espèces de nématodes présentent les mêmes avantages expérimentaux que *C. elegans*, notamment la résolution spatio-temporelle des événements subcellulaires est identique. Ceci permet d'analyser les mouvements du fuseau mitotique avec une grande précision et de les comparer entre espèces. Lors de ma thèse, j'ai étudié en détail le positionnement du NCC et du fuseau mitotique dans les embryons d'une espèce de nématode: *Caenorhabditis briggsae*.

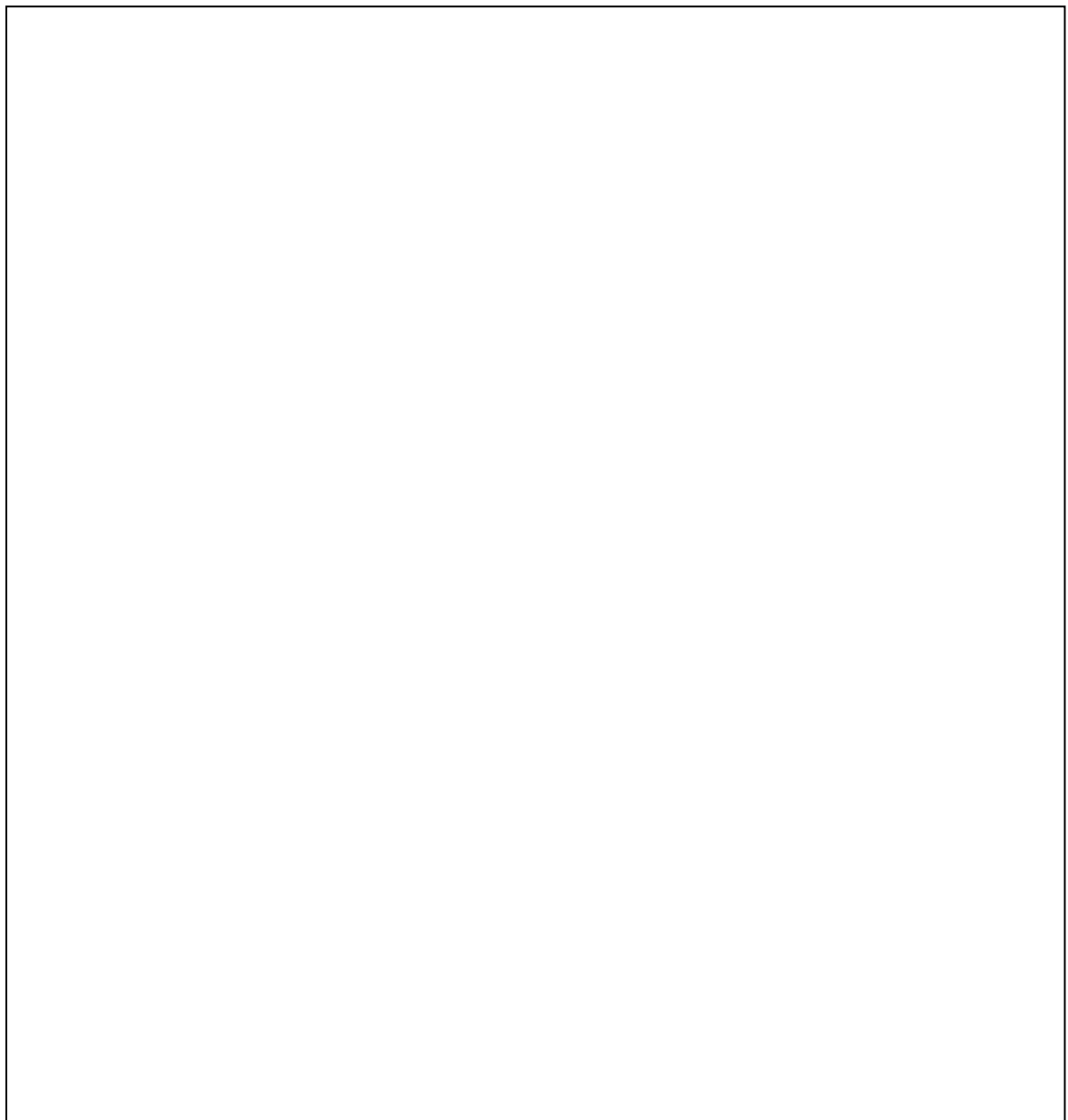


Figure 29: Arbre phylogénétique des espèces *Caenorhabditis* cultivées en laboratoire.

Les espèces en rouge sont hermaphrodites, celles en bleu sont des espèces mâle/femelle.

(Extrait de Felix *et al.*, 2014)

III.B.2. Comparaison des nématodes *C. elegans* et *C. briggsae*.

C. briggsae est une autre espèce de nématode du sol appartenant au même genre que *C. elegans* (Figure 29). Bien que très similaires morphologiquement (Figure 30), ce ne sont pas des espèces soeurs et leur divergence est estimée entre 80 et 110 millions d'années. Cette estimation est basée sur la comparaison des génomes car l'intégralité du génome de *C. briggsae* a été séquencée en 2003 (Stein et al., 2003). Comme pour *C. elegans*, le génome de *C. briggsae* est totalement annoté et accessible sur www.wormbase.org. Cette espèce présente les mêmes avantages expérimentaux que *C. elegans* que ce soit pour la maintenance (boîtes de Pétri, congélation, cycle de vie court) ou pour les études (DIC, transgénèse). De plus, comme *C. elegans*, *C. briggsae* est une espèce hermaphrodite à mâles facultatifs ce qui permet de faire des croisements. Le lignage embryonnaire a été réalisé (Zhao et al., 2008) montrant que les premières divisions se déroulent exactement de la même manière que *C. elegans* en terme de symétrie et d'asymétrie, de synchronie et d'asynchronie. Le fait de respecter les mêmes conditions d'ordre et de type de division font que les cellules génèrent les mêmes contacts cellule/cellule lors du développement de l'embryon. L'embryon au stade 1-cellule est morphologiquement identique dans les deux espèces, même si, comme nous le verrons par la suite, la taille est légèrement plus grande chez *C. briggsae* (Figure 30). Dans les deux espèces, c'est le point d'entrée du spermatozoïde qui dicte la position du futur pôle postérieur de l'embryon (Goldstein et al., 1998).

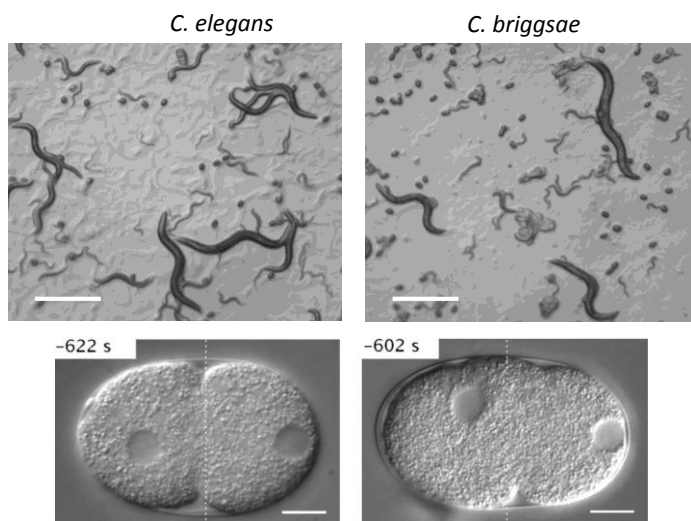


Figure 30: *C. elegans* et *C. briggsae* sont morphologiquement identiques.

Les deux espèces sont identiques macroscopiquement aussi bien pour le stade adulte que pour les différents stades larvaires et sont aussi identiques lors du développement embryonnaire.

Lorsque j'ai commencé ma thèse sur ce sujet, nous savions déjà qu'il était possible d'utiliser l'espèce *C. briggsae* pour des approches fonctionnelles. En effet, Nuez *et al.* avaient montré que *C. briggsae* est sensible au RNAi par injection, mais pas par ingestion. Cependant, l'introduction d'un transporteur d'ARN de *C. elegans*, le gène *sid-2*, dans une souche sauvage de *C. briggsae*, confère aux vers *C. briggsae* une sensibilité au RNAi par ingestion, ce qui offre un grand avantage expérimental. La possibilité de créer des animaux transgéniques dans l'espèce *C. briggsae* avait également été démontré, par injection de plasmides dans la gonade syncytial (Nuez and Félix, 2012). Cependant, comme chez *C. elegans*, ces techniques qui conduisent à la présence d'un grand nombre de transgène dans un concatémère, sont incompatibles avec l'expression de gènes dans la lignée germinale. En effet, à cause du phénomène de silencing, les transgènes présents en trop grand quantité sont réprimés. Dans l'espèce *C. elegans*, ce problème avait été contourné en 2001 par Praitis *et al.*, grâce à la technique du bombardement. Le nombre de copie du transgène reste aléatoire mais cette technique assure quand même un faible nombre de copie (entre 10 et 100) et permet également l'obtention de lignées intégrées (environ 30%) (Hochbaum *et al.*, 2010; Praitis *et al.*, 2001). Cette technique nécessite une sélection puissante des vers transformés, car étant donnée la faible efficacité du bombardement, un très grand nombre d'animaux doivent être criblés. Classiquement c'est le gène *unc-119* qui est utilisé chez *C. elegans*, comme marqueur de sélection. Les mutants *unc-119* ont la caractéristique de ne pas pouvoir se déplacer et sont incapable de rentrer en *dauer*. Le stade *dauer* permet aux vers de survivre lors d'un stress environnemental comme par exemple l'absence de nourriture. Le gène d'intérêt utilisé pour la transformation des vers est couplé au gène sauvage *Ce-unc-119*. Les vers transformés seront donc sauvages et survivront même après une longue période sans nourriture ce qui les rend facilement identifiables. Peu de temps avant le début de mon projet, le mutant *unc-119* de *C. briggsae* a été créé par le laboratoire de Waterston, permettant l'adaptation de la technique du bombardement à cette espèce. L'équipe de Waterston a montré que cette technique permettait l'expression d'une histone fusionnée à la GFP dans la lignée germinale de *C. briggsae* (Zhao *et al.*, 2010). Il nous était donc possible d'envisager de créer des lignées fluorescentes permettant l'étude du positionnement du fuseau dans l'embryon précoce de *C. briggsae* par cette technique. En revanche, aucune banque de mutants ou de phénotype RNAi n'avait encore été réalisée

pour *C. briggsae* lorsque j'ai démarré ma thèse (voir Matériel et Méthode, Verster et al., 2014)).

III.B.3. Une division, deux mécanismes ?

Avant mon arrivée dans l'équipe, la première division de l'embryon précoce de *C. briggsae* avait été filmée en optique DIC et les mouvements des pronoyaux et du fuseau mitotique comparés à ceux de *C. elegans*. Dans les deux espèces, les pronoyaux mâle et femelle se rencontrent au pôle postérieur de la cellule. En revanche, après la rencontre des pronoyaux lors de la rotation/centration, il se produit une « over-centration » c'est-à-dire que les noyaux sont légèrement excentrés vers l'antérieur. Cette « over-centration » n'apparaît pas chez *C. elegans*. De plus, l'amplitude des oscillations des asters lors de l'anaphase est beaucoup plus faible. Par analogie avec les modèles décrits chez *C. elegans*, ceci suggère que les forces de tractions sont moins importantes. Néanmoins, le fuseau mitotique est quand même déplacé vers le postérieur, il subit même un déplacement plus important que chez *C. elegans* puisqu'il part d'une position plus antérieure, pour attendre une même position finale. Une différence de force de traction entre espèce ne peut donc pas à elle seule expliquer les mouvements du fuseau entre espèces (plus grand déplacement mais plus faibles oscillations).

Dans le génome de *C. briggsae*, on retrouve toutes les protéines impliquées dans les mouvements du NCC et du fuseau chez *C. elegans*, comme par exemple GOA-1, GPA-16, LIN-5 et LET-99. De manière intéressante, il n'existe cependant qu'un seul gène codant pour la protéine GPR-2 (*Cbr-gpr-2*), alors que *C. elegans* possède deux gènes, *Ce-gpr-1* et *Ce-gpr-2* issus d'une duplication récente. En 2006, Pécréaux *et al* ont montré que *gpr-1/2* était un gène dose-dépendant et que la quantité de protéine influençait les oscillations. Au cours de ma thèse, une autre étude a montré les effets de la quantité de GPR sur les oscillations. En 2011, Redemann *et al.* ont adapté la séquence nucléotidique de GPR-1 afin de contrôler le niveau de protéine. Pour cela, ils diminuent la proportion de codons rares dans la séquence. Moins la séquence contient de codons rares et plus la transcription/traduction sera efficace, donc plus le niveau protéique augmentera. Ils montrent ainsi grâce à une expérience de rupture du fuseau que plus le niveau protéique de GPR-1 est élevé et plus les forces appliquées sur les centrosomes sont élevées (Redemann et al., 2011). Ces travaux suggèrent que la présence d'une seule copie de *gpr* dans le génome de *C. briggsae* pourrait expliquer

une diminution des oscillations et des forces de traction pendant l'anaphase. En revanche, cette hypothèse ne permettrait pas d'expliquer pourquoi le fuseau s'allonge beaucoup, ni pourquoi le NCC subirait une overcentration en présence de moins de GPR dans la cellule. Des alignements de séquences ont également montré que les protéines de ces espèces proches ne présentaient pas une grande similarité (Figure 31). Par exemple, on ne retrouve que 50-60% d'identité entre les orthologues de GPR ou LIN-5 alors que l'alignement de PAR-3 ou PAR-6 dans ces deux espèces révèle 80-90% d'identité. Il nous a donc semblé qu'une telle divergence de séquence n'était pas attendue pour des protéines aussi essentielles. Nous avons alors fait l'hypothèse que ces différences de séquences pouvaient refléter des différences de régulations des protéines entre espèces, qui se manifesteraient par des différences dans la balance des forces mécaniques, et pour finir différents mouvements du fuseau et du NCC dans les embryons.

Lors de ma thèse, j'ai exploré ces questions en étudiant en détails les phénotypes subcellulaires dans l'embryon de *C. briggsae* par rapport à *C. elegans*. Une partie de mes travaux a fait l'objet d'une première publication et est décrite dans le Chapitre 1. Notamment, l'approche comparative m'a permis de révéler un mécanisme de contrôle des oscillations commun aux deux espèces. J'ai également mis en évidence une régulation différentielle de GPR dans les deux espèces. Suite à ces premiers résultats, j'ai cherché à mieux comprendre la divergence fonctionnelle entre les orthologues de GPR. Comme nous le verrons dans le Chapitre 2, de nombreux écueils techniques ne m'ont pas permis de publier ces résultats. J'ai également tenté de mettre au point des outils pour un projet d'optogénétique, que je décris brièvement dans le Chapitre 3, même si ce travail n'a conduit à aucun résultat. En parallèle de ces travaux, j'ai collaboré avec une équipe du LBMC pour mettre au point un programme sous Image J permettant la détection automatisée des centrosomes à partir de films DIC. Ce travail est présenté dans le Chapitre 4 et a fait l'objet d'une publication. En résumé, pour cette thèse, j'ai exploré la variation cryptique d'un processus cellulaire très contraint : la première division asymétrique des embryons de nématodes. J'ai également contribué à mettre en place des outils pour l'étude de l'espèce *C. briggsae*, renforçant la place de cette espèce comme espèce satellite de *C. elegans*.

1
Celgpr1 M-DVSYYDGPKDEV---AEAMLKSAVT-----AMRLGQYEDGKGRLEEIMFEGTSN-FOLL
Celgpr2 M-DVSYYDGPKDEV---IEAMLKSAVT-----AMKLGOYEDGKGRLEDIMEFGTSN-FOLL
Cbrgpr MMDISVS--SREEEGPRDEI-INSMLNSARSAMKLGMFEEAMGRLEEILECGTTD-IQLL

61
Celgpr1 GTIYMYGRVCRHLNHDAAKALEFFFEHELMNMFKLIFNYPEACDSTRRIVEOALKMCKFPKA
Celgpr2 GTIYMYGRVCRHLNHDAAKALEFFFEHELMNMFKLIFNYPEACDSTRRIVOOALKMEKFSKA
Cbrgpr GRIYMYGRVLRYLKHETKALEFFFEHELMNVLKLTFIYPKACDSSRRIVELALSMGKISKA

121
Celgpr1 RRFAEDLIDYTSNKKNGEKYIGOARILFASVCLGECERDVESNODEKKKLLSICAEQIAA
Celgpr2 RRFAEDLIDYTSNKKNGEKYIGOARILFASVCLGECERDVESNODEKKKLLSICAEQIAA
Cbrgpr KRCAEDLIDYTSNRKEGETFVRIARTLLVTVCLEGYERKLEGNPEENKRLLTISAEQISK

181
Celgpr1 VKLPNENNTGAVSETKIMLLEAKCLSLDEKYEESRRKYQECIDFAIKTDOFEAVHIAYY
Celgpr2 VKLPNENNTGAVSETKIMLLEAKCLSLDEKYEESRRKYQECIDFAIKTDOFEAVHIAYY
Cbrgpr IKQINNEHPDNI-SKVEILMLEAKCLALQEKORESHOTYQDCIDLCKITDQLANVHRAY

241
Celgpr1 DKALYAEIDLLFFIIRDLSALFYATKFGKERDVVKYKSKLSEMLRNGEFHEAYLYGLE
Celgpr2 DKALYAEITYLLFFIIRDLSALFYATKFGKERDVVKYKSKLSEMLRNGEFHEAYLYGLE
Cbrgpr EMALYAEIGNMLIFIVNNLRSASYVVS KYGTTREVAKYKRELADKLLAFGNPHEAYCNAME

301
Celgpr1 ALVSIRKLGLNEYIGDVLLTIAKCLIALGKRROAAYFIILGSVL TINONSFKLFYEQIDV
Celgpr2 ALVSIRKLGLNEHIGDVLLTIAKCLIALGKRROAAYFIILGSVL TINOSSFKLFYEQIDV
Cbrgpr ALELIRQONLNEYLKD TLLLVAKCLAALGRRQOSAYFIVLGSVLTIKQDCFEKFKYLIDE

361
Celgpr1 AMNQERSETATDQDVCLAISSPDPTSSNDMINKFVVELEHATNVETWEMIVNGIIDDQK
Celgpr2 AMNQERSETATDQDACLAISSPDPTSSNDMINKFVVKLEHATNVETWEMIVNGIIEDQK
Cbrgpr VMTAERNDEEGKDVSLALDASADPVAPEVVTKVVVKLEHATNVETWRMVVNGIIEDQK

421
Celgpr1 KPVAI---EKKENEPPVDMMDLIFSMSSRMDDORTELPAARFIPPRPVSSASKKTTKSHR
Celgpr2 KPVAI---EKKENEPPVDMMDLIFSMSSRMDDORTELSAARFIPPRPVSSASKKTTKSHR
Cbrgpr RPAPVVEETPKENEPPMDFMDLICMNSRMDDORTAMPASIFAAPRPISAASKKTTKSHR

481
Celgpr1 ILPGLRANWTKVOSMKFDGHTMNRILKRSKSKSSLDSTNSMOGDDTRSD-DVTMTSK
Celgpr2 ILPGLRANWTKVOSMKFDGHTMNRILKRSKSKSSLDSTNSIOGDDTRSD-DVTMTSK
Cbrgpr ILPGFRANIAKIQNMKFDGQTVNKLKRSKSKSTSLHSTST-QGDDTRSDTDATVLSK

Figure 31: Alignement des séquences de Ce-GPR-1, Ce-GPR-2 et Cbr-GPR-2.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Souches de nématode

Les souches de *C. briggsae* et *C. elegans* sont maintenues sur boîtes de Pétri contenant du Nematode Growth Medium (NGM : NaCl 3g, Bactopeptone 2,5g, Bactoagar 20g, H₂O qsp 1L, autoclave, ajout cholestérol 1M 1mL, CaCl₂ 1M 1mL, MgSO₄ 1M 1mL, KPO₄ 1M 25mL) ensemencées avec des *E. coli* OP50. Les souches sont maintenues à 20°C et filmées à 23°C. Pour les tests de température JU1018 a été placée à 28°C pendant 5 jours et filmée à 28°C. Les lignées fluorescentes sont maintenues à 25°C ainsi que les lignées mutées pour le gène *unc-119*.

La souche de référence pour *C. elegans* est N2 provenant de Bristol. *C. elegans* est naturellement sensible au RNAi par ingestion. Ce n'est pas le cas de la souche de référence de *C. briggsae* AF16. Une lignée dérivée sensible au RNAi a donc été créée exprimant le gène *Ce-sid-2* codant pour une protéine transmembranaire indispensable au transport des doubles brins d'ARN effecteurs du RNAi sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire (Nuez and Félix, 2012). Nous avons établi que AF16 et JU1018 (*mfls42 [Ce-sid-2 + Ce-myo-2::DsRed]*) ont des phénotypes identiques au niveau des deux premières divisions embryonnaires. À ce jour, il n'existe que trois espèces hermaphrodites au sein du genre *Caenorhabditis* et seuls *C. elegans* et *C. briggsae* ont leur génome séquencé.

D'autres souches ont également été utilisées: *C. elegans* VC1670 *gpr-1 (ok2126)*, *C. elegans* RB1150 *gpr-2 (ok1179)* (correspondant à des pertes de fonction des protéines GPR-1 ou GPR-2 suite à des délétions homozygotes de chacun des gènes (900 et 700 bp environ respectivement)) (*Caenorhabditis* Genetics Center (CGC)). Nous avons également analysé d'autres isolats sauvages de chaque espèce qui sont à la fois distincts géographiquement et génétiquement des souches de référence : *C. elegans* CB4856, LKC34 et JU258, *C. briggsae* ED3092, HK104 et QR24. Ces souches sont répertoriées dans le Tableau 2 et décrites dans Riche *et al.*, 2013.

Les autres souches ont été créées dans l'équipe ou données par d'autres équipes. Ces souches sont répertoriées dans le Tableau 3.

Tableau 2 : Lignées utilisées pour l'étude des mouvements des centrosomes en DIC.

Nom	Espèce (de)	Phénotype	Génotype	Provenance
N2	<i>C. elegans</i> (Bristol)	Sauvage		CGC
RB1150	<i>C. elegans</i>	Δ gpr-2	<i>gpr-2(ok1179) III</i>	CGC
VC1670	<i>C. elegans</i>	Δ gpr-1	<i>gpr-1(ok2126) I</i>	CGC
CB4856	<i>C. elegans</i> (Hawaii)	Sauvage		Felix lab
LKC34	<i>C. elegans</i> (Madagascar)	Sauvage		Braendle lab
JU258	<i>C. elegans</i> (Madère)	Sauvage		Felix lab
JU1018	<i>C. briggsae</i>	Ce-sid-2	<i>mfls42 [Ce-sid-2 + Ce-myo-2::DsRed]</i>	Felix lab
HK104	<i>C. briggsae</i> (Okayama)	Sauvage		Felix lab
ED3092	<i>C. briggsae</i> (Nairobi)	Sauvage		Braendle lab
QR24	<i>C. briggsae</i> (Montréal)	Sauvage		Braendle lab
MT2426	<i>C. elegans</i>	Δ goa-1	<i>goa-1(n1134) I</i>	CGC
BW1809	<i>C. elegans</i>	Δ gpa-16	<i>gpa-16(it143) I; him-5(e1490) V</i>	CGC

Tableau 3 : Lignées transgéniques ou mutantes utilisées dans les différentes études.

Nom	Espèce	Phénotype	Croisement	Provenance	Génotype
HT1593	<i>C. elegans</i>	Ce-unc-119		Carre-Pierrat	<i>unc-119(ed3) III</i>
RW20000	<i>C. briggsae</i>	Cbr-unc-119		Waterston lab	<i>st20000</i>
EG6699	<i>C. elegans</i>	<i>C. elegans</i> insertion Mos1 chr II		CGC	<i>ttTi5605 II; Ce-unc-119(ed3) III</i>
EG6701	<i>C. elegans</i>	<i>C. elegans</i> insertion Mos1 chr I		CGC	<i>ttTi4348 I; Ce-unc-119(ed3) III</i>
ANA035	<i>C. briggsae</i>	GFP ::Cbr-gpr-2 ; Ce-sid-2	ANA007 x JU1018	Soizic, Marie	<i>st20000 ; adels5 [pMD051, Ce-unc119 + pie-1::GFP::Cbr-gpr-2] ; mfls42 [Ce-sid-2 + Ce-myo-2::DsRed]</i>
ANA017	<i>C. briggsae</i>	GFP ::Cbr-gpr-2 ; Ce-sid-2	ANA010 x JU1018	Soizic, Marie	<i>st20000 ; adels3 [pMD051, Ce-unc119 + pie-1::GFP::Cbr-gpr-2] ; mfls42 [Ce-sid-2 + Ce-myo-2::DsRed]</i>
ANA064	<i>C. elegans</i>	GFP ::Cbr-gpr-2		Melissa	<i>ttTi5605 II; Ce-unc-119(ed3) III; adels11 [pMD142, Ce-unc-119 + pie-1::GFP::Cbr-gpr-2:: pie-1] II ;</i>
ANA097	<i>C. briggsae</i>	GFP ::Ce-gpr-2 ; Ce-sid-2	ANA025 x JU1018 (3 fois)	Noémie, Soizic	<i>Ce-unc-119(ed3) III; adels2 [pMD078, Ce-unc-119 + pie-1::GFP::Ce-gpr-2:: pie1] ; mfls42 [Ce-sid-2 + Ce-myo-</i>

					2::DsRed]
ANA041	<i>C. briggsae</i>	GFP ::Cbr-par-6; Ce-sid-2	ANA034 x JU1018	Noémie, Marie	<i>st20000; adeEx9 [pMD089, Ce-unc-119; pie-1 ::GFP::Cbr-par-6 ::pie-1]; mfls42 [Ce-sid-2 + Ce-myo-2::DsRed]</i>
ANA069	<i>C. briggsae</i>	GFP ::Cbr-par-2; Ce-sid-2	ANA066 x JU1018	Caroline Marie	<i>st20000; adels27 [pMD238, Ce-unc-119; pie-1 ::GFP::Cbr-par-2 ::pie-1]; mfls42 [Ce-sid-2 + Ce-myo-2::DsRed]</i>
TH251	<i>C. elegans</i>	YFP ::Ce-gpr-1 CAI 0,3		Hyman lab	<i>Ce-unc-119(ed3) III; ddls33[yfp::gpr-1(synthetic, CAI 0.3, artificial introns); unc-119(+)]</i>
TH79	<i>C. elegans</i>	YFP ::Ce-gpr-1		Hyman lab	<i>Ce-unc-119(ed3) III; ddls21[yfp::gpr-1; unc-119(+)]</i>
ANA022	<i>C. briggsae</i>	GFP ::Cbr-his-11; GFP ::Cbr-tbg-1; Ce-sid-2	ANA016 x ANA019	Soizic, Marie	<i>st20000; adels16 [pMD016, pie-1::GFP::Ce-his-11]; adels14 [pMD015, Cepie-1::GFP::Ce-tbg-1]; mfls42 [Ce-sid-2 + Ce-myo-2::DsRed]</i>
TH30	<i>C. elegans</i>	GFP ::Ce-his-11; GFP ::Ce-tbg-1		Hyman lab	<i>Ce-unc-119(ed3) III; ruls32[pAZ132, Ce-pie-1 ::GFP ::his-11] III; ddls6 [pAD3, Cepie-1::GFP::Ce-tbg-1]</i>
ANA098	<i>C. elegans</i>	GFP ::Chim2		Soizic	<i>Ce-unc-119(ed3) III; adels28 [pMD335, Ce-unc-119 + pie-1::GFP::Cb Nter/Ce Cter-gpr:: pie-1] II</i>
ANA112	<i>C. briggsae</i>	GFP ::Chim2		Soizic	<i>st20000; adeEx12 [pMD335, Ce-unc-119 + pie-1::GFP::Cb Nter/Ce Cter-gpr:: pie-1]</i>
ANA0063	<i>C. elegans</i>	MT2426xBW1809 stérile donc a été balancé	(MT2426xBW1809)X RB1189	Soizic	<i>goa-1(n1134) I ; gpa-16(it143) I; him-5(e1490) V; chs-1(ok1120) I/hT2 [bli-4(e937) let-?(q782) qls48] (I;III)</i>
RB1189	<i>C. elegans</i>	myo-2::GFP ; pes-10::GFP gut enhancer fused to GFP Balancé hT2		Palladino lab	<i>chs-1(ok1120) I/hT2 [bli-4(e937) let-?(q782) qls48] (I;III)</i>

Cinq lignées intégrées indépendantes ont été obtenues dans *C. briggsae* pour GFP::*Cbr-GPR-2* (ANA007 à ANA010), une pour GFP::*Cbr-PAR-2* (ANA066), une pour GFP::*Ce-GPR-2* (ANA025) et une lignée non intégrée pour GFP::*Cbr-PAR-6* (ANA034). Chacune de ces lignées a été rétrocroisée avec JU1018 afin qu'elles aient le gène *Ce-sid-2* et soient sensibles au RNAi par ingestion. Ces lignées ont ensuite été renommées (voir Tableau 2). La lignée GFP::*Ce-GPR-2* (ANA025) a été rétrocroisée trois fois avec JU1018. Cette souche a été renommée ANA097. Les lignées présentent un phénotype sauvage à l'exception de deux lignées : ANA017 et ANA097. ANA017 présente le signal cortical GFP le plus fort mais aussi d'importants mouvements de rocking du NCC pendant l'overcentration ainsi que de fortes oscillations du fuseau (voir Résultats – Chapitre 1). À l'inverse ANA025 présente une légère diminution des oscillations qui est toujours présente même après avoir été croisée trois fois avec JU1018 (voir Résultats – Chapitre 2).

La lignée ANA022 (*C. briggsae pie-1::Ce-his-11::GFP; pie-1::Ce-tbg-1::GFP; Ce-sid-2*) a été obtenue par croisement de deux lignées créées dans le laboratoire : ANA019 (*C. briggsae pie-1::Ce-tbg-1::GFP; Ce-sid-2*) and ANA016 (*C. briggsae pie-1::Ce-his-11::GFP*). La lignée TH30 (*C. elegans pie-1::Ce-his-11::GFP; pie-1::Ce-tbg-1::GFP*) est la lignée analogue chez *C. elegans* et nous a été donnée par Anthony Hyman. Ces deux lignées ont initialement été utilisées pour l'analyse des oscillations dans les deux espèces. Ces lignées permettaient de simplifier la détection de l'anaphase ainsi que le suivi des centrosomes pour l'analyse des oscillations du fuseau. Cependant, les oscillations du fuseau mitotique de ANA022 se sont avérées être plus faibles que celles de la souche sauvage JU1018. Ces lignées n'ont donc pas été utilisées pour cette étude et les analyses ont été poursuivies avec les lignées de référence N2 et JU1018 ainsi que d'autres souches sauvages.

Les lignées TH79 et TH251 ont été générées par bombardement d'un transgène *YFP::Ce-gpr-1* dans *C. elegans*. Ces lignées nous ont été données par Anthony Hyman.

ANA098 est une lignée intégrée obtenue par microinjection du plasmide pMD335 (GFP::*Chim2*) dans la souche *C. elegans* HT1593. Cette lignée exprime un fort signal cortical de la GFP (voir Résultats - Chapitre 2).

ANA112 est une lignée non intégrée obtenue par bombardement du plasmide pMD335 (GFP::*Chim2*) dans la souche *C. briggsae* RW20000 (voir Résultats - Chapitre 2).

II. Clonages Moléculaires

II.A. Clonages par Enzyme de restriction

II.A.1. Plasmides pour RNAi

Toutes les séquences des gènes ont été récupérées sur www.wormbase.org pour choisir les séquences des amorces.

Les gènes *Cbr-gpb-1* (Gβ), *Cbr-gpr-2*, *Cbr-lin-5*, *Cbr-goa-1*, *Cbr-gpa-16*, *Cbr-par-2*, *Cbr-let-99*, *Cbr-csnk-1*, *Cbr-cid-1* et *Cbr-C27D9.1* ont été amplifiés à partir de l'ADN génomique (ADNg) de AF16 alors que *Ce-gpr-1/2*, *Ce-lin-5*, *Ce-goa-1* et *Ce-gpa-16* ont été amplifiés à partir de l'ADNg de N2. Ces gènes ont été clonés dans le plasmide L4440 (Tableau 4). Les gènes sont flanqués par deux promoteurs T7 permettant la transcription et la formation d'un double brin d'ARN (voir § IV).

Tableau 4 : Liste des plasmides utilisés pour l'inactivation des gènes par RNAi.

N° du plasmide	Provenance	Insert	N° du plasmide	Provenance	Insert
pMD059	Lab member	<i>Cbr-gpb-1</i>	pMD072	Soizic	<i>Cbr-lin5</i>
pMD052	Soizic	<i>Cbr-gpr-2</i>	pMD276	Gonczy lab	<i>Ce-lin-5</i>
pMD082	Gonczy lab	<i>Ce-gpr-1/2</i>	pMD058	Lab member	<i>Cbr-gpa-16</i>
pMD319	Soizic	<i>Ce-gpr Nter</i>	pMD057	Lab member	<i>Cbr-goa-1</i>
pMD317	Soizic	<i>Cbr-gpr Nter</i>		Soizic	<i>Ce-gpa-16</i>
pMD291	Soizic	<i>Ce-gpr Cter + 3'UTR</i>	pMD334	Banque Julie Ahringer	<i>Ce-goa-1</i>
pMD292	Soizic	<i>Cbr-gpr Cter + 3'UTR</i>	PMD160	Soizic, Melissa	<i>Cbr-cid-1</i>
pMD333	Soizic	<i>Ce-gpr Cter (short) + 3'UTR</i>	PMD161	Soizic, Melissa	<i>Cbr-C27D9.1</i>
pMD318	Soizic	<i>Cbr-gpr Cter (short) + 3'UTR</i>	pMD206	Banque Julie Ahringer	<i>Ce-C13F10.1</i>

pMD060	Lab member	<i>Cbr-par-2</i>	pMD205	Banque Julie Ahringer	<i>Ce-atn-1</i>
	Soizic	<i>Cbr-let-99</i>	pMD338	Soizic	<i>Cbr-prg-1</i>
pMD293	Soizic	<i>Cbr-csnk-1</i>		Maité Carre Pierrat	<i>Ce-prg-1</i>

II.A.2. Plasmides de transgénèse par bombardement

Les gènes *Cbr-gpr-2* et *Cbr-par-6* ont été amplifiés dans leur totalité à partir de l'ADNg de AF16 alors que *Cbr-par-2* a été amplifié à partir de l'ADN complémentaire (ADNc). Le gène *Ce-gpr-2* a été amplifié à partir de l'ADNg de N2. Ces gènes ont été clonés par enzyme de restriction au niveau du site SphI en position C-terminale et en phase avec la GFP dans le plasmide TH303 (donné par Anthony Hyman). Ces gènes sont placés sous le contrôle du promoteur du gène *pie-1* de *C. elegans* ainsi que de son 3'UTR afin de permettre une expression forte dans les cellules de la lignée germinale. Le vecteur comprend également le gène de sélection *Ce-unc-119* ainsi que son promoteur.

II.A.3. Plasmides de double hybride

Cbr-gpr-2 et *Cbr-lin-5* ont été amplifiés à partir de l'ADNc de JU1018. *Cbr-gpr-2* a été cloné par enzyme de restriction au niveau des sites XmaI/NotI en position C-terminale et en phase avec le domaine de liaison dans le plasmide pPC97 (donné par Sander van den Heuvel). *Cbr-lin-5* a été cloné par enzyme de restriction au niveau des sites AscI/NotI en position C-terminale et en phase avec le domaine d'activation dans le plasmide pPC86 (donné par Sander van den Heuvel). *Cbr-goa-1* et *Cbr-gpa-16* ont également été amplifiés à partir de l'ADNc de JU1018. Alors que *Ce-goa-1* et *Ce-gpa-16* ont été amplifiés à partir de l'ADNc de N2. Ces gènes ont été clonés chacun dans les deux plasmides au niveau des mêmes sites de restriction. Les plasmides sont répertoriés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Liste des plasmides utilisés pour le double hybride.

Nom du plasmide	Provenance	Insert	Vecteur
pMD213	Sander van den Heuvel	<i>Ce-gpr-1</i>	pPC97
pMD212	Sander van den Heuvel	<i>Ce-lin-5</i>	pPC86
pMD242	Soizic	<i>Cbr-gpr-2</i>	pPC97
pMD241	Soizic	<i>Cbr-lin-5</i>	pPC86
pMD341	Soizic	<i>Cbr-goa-1</i>	pPC97
pMD299	Soizic	<i>Cbr-goa-1</i>	pPC86
pMD339	Soizic	<i>Ce-goa-1</i>	pPC97
pMD297	Soizic	<i>Ce-goa-1</i>	pPC86
pMD300	Soizic	<i>Cbr-gpa-16</i>	pPC86
pMD340	Soizic	<i>Ce-gpa-16</i>	pPC97
pMD298	Soizic	<i>Ce-gpa-16</i>	pPC86

II.A.4. Plasmides pour purification de protéines

Cbr-gpr-2 a été amplifié à partir de l'ADNc de JU1018 et *Ce-gpr-2* a été amplifié à partir de l'ADNc de N2. Ces gènes ont été clonés par enzyme de restriction au niveau des sites *Sma*I/*Not*I en position C-terminale et en phase avec la GST dans le plasmide pPGEX6P3.

II.B. Clonages par Gateway Multisite

La technique de Gateway Multisite permet d'aligner dans un même vecteur final (le vecteur de « destination » ou pDEST) plusieurs séquences d'ADN (un promoteur, un gène d'intérêt et une séquence 3'UTR par exemple), dans un ordre et une orientation choisis, en utilisant la recombinaison site spécifique. Cette technique permet donc de cloner plusieurs fragments d'ADN en une seule fois tout en contrôlant l'ordre de ces séquences.

Les séquences génomiques de *gfp::Cb-gpr-2* et *gfp::Ce-gpr-2* ont été amplifiées à partir des plasmides pMD051 et pMD078 respectivement, puis clonés avec le kit Multisite

Gateway® Three-Fragment Vector Construction (Invitrogen) dans le pCFJ150 ou le pCFJ210 avec le promoteur *Ce-pie-1* en 5' (pCG142) et l'UTR de *Ce-pie-1* en 3' (pCM5.47). Les plasmides pCFJ150 et pCFJ210 sont des plasmides de réparation utilisés pour faire de la transgénèse par MosSCI et nous ont été fournis par Addgene. Le plasmide pCFJ150 permet une insertion du transgène sur le chromosome II de *C. elegans* alors que le pCFJ210 permet une insertion du transgène sur le chromosome I. Les plasmides pCG142 et pCM5.47 nous ont été donnés par le laboratoire de Geraldine Seydoux.

Les plasmides finaux contenant *Ce-pie-1::GFP::Cbr-gpr-2::Ce-pie-1 3'UTR* sont renommés pMD141 et pMD244 lorsque le plasmide de destination est pCFJ150 ou pCFJ210 respectivement. De la même manière, les plasmides finaux contenant *Ce-pie-1::GFP::Ce-gpr-2::Ce-pie-1 3'UTR* sont renommés pMD142 et pMD207 lorsque le plasmide de destination est pCFJ150 ou pCFJ210 respectivement.

La protéine chimère 2 est composée de la partie Nter de Cbr-GPR-2 et de la partie Cter de Ce-GPR-1. La séquence génomique a été générée par PCR fusion puis insérée dans le pCFJ210 avec le promoteur *Ce-pie-1* et le 3'UTR *Ce-pie-1*. Cette séquence a également été insérée dans le pCFJ906 qui est un plasmide de réparation utilisé pour la transgénèse par MiniMos qui nous a également été fourni par Addgene. Ce plasmide permet l'insertion d'un gène d'intérêt en simple copie à une position aléatoire dans le génome. Ceci permet l'insertion du transgène dans n'importe quelle lignée toutefois on perd le contrôle de la localisation du transgène.

La protéine chimère 1 est composée de la partie Nter de Ce-GPR-1 et de la partie Cter de Cbr-GPR-2. La séquence génomique a été synthétisée par Genscript et clonée dans le pCFJ906 avec le promoteur *Ce-mex-5* et le 3'UTR *Ce-pie-1*.

La séquence de *cry-2* a été amplifiée à partir du plasmide X-343 donné par Mathieu Coppey. Elle a été clonée en phase et en position N-terminale de la mcherry dans les plasmides pCFJ210 et pCFJ906 sous contrôle de différents promoteurs de la lignée germinale (voir Tableau 6).

Les séquences *cibn::gfp::caax* et *myr::gfp::cibn* ont été synthétisées par Genscript. Les séquences ont été codon-optimisées pour l'expression dans *C. elegans*. Elles ont été clonées dans le plasmide pCFJ906 sous contrôle de différents promoteurs de la lignée germinale (voir Tableau 6).

La construction des plasmides est répertoriée dans le

Tableau 6.

Tableau 6: Liste des plasmides clonés par Gateway utilisés pour la transgénèse par microinjection.

Plasmide pDEST	promoteur	Insert	3'UTR	Nom du plasmide final
pCFJ150	Ce-pie-1 (pCG142)	gfp::Cbr-gpr-2 (pMD0139)	Ce-pie-1 (pCM5.47)	pMD141
pCFJ150	Ce-pie-1 (pCG142)	gfp::Ce-gpr-2 (pMD0140)	Ce-pie-1 (pCM5.47)	pMD142
pCFJ210	Ce-pie-1 (pCG142)	gfp::Cbr-gpr-2 (pMD0139)	Ce-pie-1 (pCM5.47)	pMD244
pCFJ210	Ce-pie-1 (pCG142)	gfp::Ce-gpr-2 (pMD0140)	Ce-pie-1 (pCM5.47)	pMD207
pCFJ210	Ce-pie-1 (pCG142)	gfp::chim2 (pMD294)	Ce-pie-1 (pCM5.47)	pMD295
pCFJ906	Ce-pie-1 (pCG142)	gfp::chim2 (pMD294)	Ce-pie-1 (pCM5.47)	pMD335
pCFJ906	Ce-mex-5 (pMD193)	gfp::chim1 (pMD390)	Ce-pie-1 (pCM5.47)	pMD391
pCFJ906	Ce-mex-5 (pJA245)	gfp::chim1 (pMD390)	Ce-pie-1 (pCM5.47)	pMD392
pCFJ210	Ce-pie-1 (pCG142)	cry-2:: mcherry (pMD336)	Ce-tbb-2 (pMD046)	pMD345
pCFJ906	Ce-spd-1 (pMD343)	cry-2:: mcherry (pMD336)	Ce-tbb-2 (pMD046)	pMD372
pCFJ906	Ce-pie-1 (pCG142)	cibn::gfp::caax (pMD357)	Ce-pie-1 (pCM5.47)	pMD370
pCFJ906	Ce-pie-1 (pCG142)	myr::gfp::cibn (pMD356)	Ce-pie-1 (pCM5.47)	pMD371
pCFJ906	Ce-spd-1 (pMD343)	cibn::gfp::caax (pMD357)	Ce-pie-1 (pCM5.47)	pMD374
pCFJ906	Ce-spd-1 (pMD343)	myr::gfp::cibn (pMD356)	Ce-pie-1 (pCM5.47)	pMD373

III. Transgénèse

III.A. Lignées créées par bombardement

La transgénèse par bombardement est possible mais chez *C. elegans* nous utilisons une lignée mutée pour le gène *Ce-unc-119*, HT1593, qui rend les vers immobiles et les empêche de rentrer en *dauer*. Le stade *dauer* permet aux vers de survivre lors d'un stress environnemental comme par exemple l'absence de nourriture. Cette lignée permet une forte sélection après la transgénèse. En effet le gène d'intérêt utilisé pour la transformation des vers est couplé au gène sauvage *Ce-unc-119*. Les vers transformés seront donc sauvages et survivront même après une longue période sans nourriture. La lignée équivalente de *C. briggsae* mutée pour *Cbr-unc-119*, RW20000 (*st20000*), a été générée par le laboratoire de Waterston et nous l'avons acquise en 2009. Nous avons utilisé cette lignée pour créer toutes nos lignées transgéniques fluorescentes chez *C. briggsae* (Zhao et al., 2010).

Dans les deux espèces nous utilisons le même protocole. Quatre microgrammes de plasmides contenant le gène d'intérêt et le gène de sélection sont utilisés pour enrober des billes d'or qui sont déposées sur sept macrocarriers qui sont des membranes de plastique. Ces membranes sont ensuite placées dans l'hepta-adaptateur du système BioRad Biolistic PDS-1000 HE permettant ainsi de multiplier par sept le nombre de faisceaux de billes projetés sur les vers. Les vers RW20000 *Cbr-unc-119 (st20000)* sont regroupés à confluence sur une boîte NGM nonensemencée qui est ensuite positionnée dans le « gene gun ». Le vide est effectué rapidement et maintenu à 27inHg dans la chambre de bombardement. La pression d'hélium est ensuite augmentée dans la chambre de concentration du gaz jusqu'à la rupture du disque autour de 1500psi. Chaque construit étant bombardé 2 fois pour un meilleur rendement, lors du deuxième tir, la boîte de vers est pivotée de 20° afin de couvrir une plus grande surface de la boîte et transformer un plus grand nombre de vers. Les vers sont laissés pendant 1 heure à RT, lavés dans du M9 stérile puis répartis sur 8 grandes boîtes NGM ensemencées d'OP50. Les boîtes sont laissées pendant deux semaines jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de nourriture. Puis les vers qui ont retrouvé une mobilité sont sélectionnés.

Cinq lignées intégrées indépendantes *C. briggsae* ont été obtenues pour GFP::*Cbr-GPR-2* (ANA007 à ANA010), une pour GFP::*Cbr-PAR-2* (ANA066), une pour GFP::*Ce-GPR-2* (ANA025) et une lignée non intégrée pour GFP::*Cbr-PAR-6* (ANA034).

Les plasmides utilisés pour la micro-injection pMD335 et 391 (voir § II.B) ont également été bombardés dans RW20000. Une lignée non intégrée a été obtenue pour pMD335 (GFP::*Chim2*): ANA112. Aucune lignée n'a été obtenue pour pMD391 (GFP::*Chim1*).

III.B. Lignées créées par microinjection (MosSCI, MiniMos)

Les transgénèses par MosSCI ou MiniMos sont des techniques qui utilisent les propriétés des transposons pour insérer le fragment d'intérêt. Pour le MosSCI des transposons Mos1 (provenant de chez la drosophile) ont été insérés dans le génome de *C. elegans* (Bessereau *et al.*, 2001). Après excision des transposons par une transposase, il en résulte une cassure double brin qui va pouvoir être réparée par recombinaison homologue. Un plasmide permettant l'expression d'une transposase dans la lignée germinale est donc injecté dans la gonade avec un plasmide de réparation exprimant un gène d'intérêt flanqué

des séquences situées de part et d'autres du Mos1. Après élimination du Mos1 par la transposase, la cassure double brin peut être réparée par recombinaison homologue grâce au plasmide co-injecté permettant ainsi l'insertion de la séquence d'intérêt à un site connu du génome (Robert et al., 2009). Cette technique a été adaptée dans l'espèce *C. briggsae*. La lignée possédant un Mos1 dans son génome a été créée par Marie-Anne Félix. Une ingénieure de l'équipe a identifié la région d'insertion du Mos1 et construit le plasmide de réparation. Elle a ensuite réussi à obtenir une lignée GFP :: tubuline chez *C. briggsae* avec cette technique. Pour le MiniMos c'est la propriété inverse qui est utilisée, c'est à dire la propriété d'insertion dans le génome de cet élément mobile. Un plasmide a été construit de manière à ce que les séquences minimales requises pour l'insertion du transposon soient flanquées de part et d'autre de la séquence du gène *unc-119* et d'un site d'insertion d'un transgène : le pCFJ906. En microinjectant ce plasmide dans la gonade avec une transposase, la séquence d'ADN située entre les régions du Mos1 va pouvoir s'insérer n'importe où dans le génome. Avec cette technique on perd alors le contrôle du site d'insertion (Frøkjær-Jensen et al., 2014).

Le mix de microinjection contient le plasmide de réparation, un plasmide exprimant la transposase sous contrôle du promoteur de la lignée germinale *eft-3* (pCFJ60), ainsi que trois plasmides exprimant la mcherry sous différents promoteurs afin de contrôler le succès des microinjections : *rab-3::mcherry* (pGH8), *myo-2::mcherry* (pCFJ90), *myo-3::mcherry* (pCFJ104). Des vers de phénotype *unc-119* sont microinjectés. Après une semaine, seules les boîtes où des vers WT expriment la mcherry sont conservées pendant deux semaines supplémentaires. Après ces deux semaines, seuls les vers WT n'exprimant plus la mcherry sont sélectionnés puis maintenus pour vérification de l'expression des transgènes. Ces animaux ont normalement perdu l'extrachromosome (d'où la perte du signal mcherry) mais auront récupéré le gène *unc-119* par recombinaison homologue de l'insert du plasmide de réparation.

Les plasmides pMD141, 142, 207 et 244 ont été microinjectés plusieurs fois dans les lignées de *C. elegans* EG6699 et EG6701 par une ingénieure de l'équipe. Ces lignées possèdent une mutation pour le gène *Ce-unc-119* ainsi qu'une insertion du transposon Mos1 sur le chromosome I pour EG6701 et sur le chromosome II pour EG6699. Une seule lignée a

été obtenue à partir du pMD141 exprimant un fort signal cortical de la GFP : ANA064. Pour les autres plasmides aucune lignée n'a été obtenue.

Le plasmide final pMD335 a été microinjecté dans la lignée *C. elegans* HT1593 qui est mutée pour le gène *Ce-unc-119*. Une lignée a été obtenue exprimant un fort signal cortical de la GFP : ANA098. Ce plasmide a également été microinjecté dans des vers *C. briggsae* RW20000 qui est mutée pour le gène *Cbr-unc-119*, mais aucune lignée n'a été obtenue.

Le plasmide final pMD391 a été microinjecté dans les lignées HT1593 et RW20000. Aucune lignée n'a été obtenue.

IV. Inactivation des gènes par RNAi

Nous avons utilisé la technique de RNAi par ingestion pour l'inactivation des gènes ciblés dans les deux espèces. Ces gènes ont été clonés dans le plasmide L4440 et les construits ont été utilisés pour transformer des bactéries HT115 qui ne produisent pas de RNase H et ne dégradent pas l'ADN double brin (ADN db). Deux promoteurs T7 encadrent le gène d'intérêt, et sont inductibles à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). L'IPTG est ajouté à une culture bactérienne de densité optique égale à 1 pour avoir une concentration finale de 1mM. L'activation des promoteurs déclenche la transcription du gène d'intérêt dans les deux sens permettant la production d'un ARN double brin (ARN db) par les bactéries. Les vers vont se nourrir de ces bactéries et ingérer l'ARN db qui va alors être diffusé dans toutes les cellules y compris les cellules de la lignée germinale. De petits ARN db du gène d'intérêt vont être générés par la machinerie cellulaire et provoquer l'inactivation de celui-ci.

Tous les clones dirigés contre des gènes de *C. briggsae* ont été créés dans l'équipe. Certains clones dirigés contre des gènes de *C. elegans* ont été créés dans l'équipe mais d'autres ont été récupérés directement dans la banque de RNAi de Julie Ahringer (Kamath et al., 2003; voir § II.A.1).

En fonction du gène à inactiver les vers sont sélectionnés à un stade larvaire précis lié au temps d'inactivation qui sera appliqué. Ils sont déposés sur les boîtes NGMensemencées de la culture bactérienne induite à l'IPTG. Les vers sont laissés à 20 ou 25°C entre 24 et 48 heures sur les boîtes, la durée variant en fonction du gène étudié. Un temps d'inactivation plus long est souvent nécessaire pour *C. briggsae* afin d'obtenir le phénotype le plus fort. Les adultes sont ensuite disséqués pour analyser les embryons. Les temps d'inactivation sont répertoriés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Temps d'inactivation utilisés pour les RNAi des différents gènes.

Gènes	<i>C. briggsae</i>	<i>C.elegans</i>	Gènes	<i>C.briggsae</i>	<i>C. elegans</i>
<i>gpr</i>	48H	40-44H	<i>cid-1</i>	48H	30H
<i>Nter gpr</i>	48H	40-44H	<i>C27D9.1</i>	48-64H	26H
<i>Cter gpr</i>	48H	40-44H	<i>csnk-1</i>	36-48H	Non testé
<i>lin-5</i>	24-48H	24-40H	<i>gpr; csnk-1</i>	48H <i>gpr</i> + 36-42H <i>csnk-1</i>	Non testé
<i>goa-1; gpa-16</i>	24H <i>goa-1</i> + 48H <i>goa-1; gpa-16</i>	Non testé			
<i>gpb-1</i>	48-60H	24H			
<i>let-99</i>	54-64H	48H			

V. Imagerie

V.A. Films en DIC

La technique DIC est une technique en contraste de phase qui produit des images ayant un effet de relief en 3D permettant d'identifier facilement les structures cellulaires comme les noyaux, les centrosomes et les granules vitellins. Des vers hermaphrodites adultes gravides sont disséqués dans du M9 (Na_2HPO_4 6g, KH_2PO_4 3g, NaCl 5g, H_2O qsp 1L autoclave, ajout MgSO_4 1mM final) qui est un milieu physiologique pour les vers. Les embryons sont montés sur un coussin d'agarose 2% entre lame et lamelle. Les embryons sont visualisés avec un microscope AxioImager A2 Zeiss. Le microscope est équipé d'un objectif x100 à huile et d'une lentille Plan Apochromat NA 1.4. Les images sont enregistrées toutes les 0,5s par une caméra Kappa DX4-285FW en format .tiff et sont convertis en film Quicktime grâce au logiciel ImageJ.

La division est filmée de l'apparition des pronoyaux à la fin de la première cytokinèse. Nous avons défini $t = 0$ sec comme étant la séparation des chromosomes au commencement

de l'anaphase qui est détectable en DIC. Tous les embryons sont filmés à 23°C, la durée du cycle cellulaire étant similaire dans les deux espèces à cette température.

V.B. Confocal Spinning Disk

Les embryons sont montés de la même manière que pour les films en DIC. Les embryons sont visualisés avec un microscope Confocal Spinning Disk Leica. Le microscope est équipé d'un objectif x100 à huile et d'une lentille HCX PL APO 1.4 , d'un objectif x63 à eau. Un filtre GFP est utilisé, le temps d'exposition des embryons est de 200ms en DIC et 500ms pour le laser $\lambda = 491\text{nm}$, avec une puissance laser de 25-30%.

Les images sont enregistrées toutes les 0,5s par une caméra Quantem ou Andor (iXion3 897) en format .tiff et sont convertis en film Quicktime grâce au logiciel ImageJ.

V.C. Confocal LSM 710

Les embryons immunomarqués sont imagés par un microscope spectral confocal Leica SP5 (63x) ou un microscope spectral confocal Zeiss LSM710 (63x). Les images sont traitées avec ImageJ.

V.D. Tracking des centrosomes

V.D.1. Tracking Manuel

La position des centrosomes a été suivie avec ImageJ grâce au plugin « Manual Tracking ». Les positions ont été mesurées toutes les 0,5 secondes de la fin de l'étape de centration/rotation à la cytokinèse. Pendant la mitose, les contractions corticales sont réduites et la taille de l'embryon est constante. Les positions sont normalisées en pourcentage de la longueur et de la largeur de l'embryon. 0% correspondant au pôle antérieur et 100% au pôle postérieur. La position des centrosomes le long de l'axe A/P ou l'axe transverse est tracée en fonction du temps. Les graphes ont été obtenus sous Excel.

Les données normalisées sont analysées par un programme Matlab créé par Françoise Argoul (Laboratoire de Physique, ENSL) afin de calculer les amplitudes moyennes et maximales ainsi que les fréquences moyennes et maximales pour les oscillations des centrosomes antérieur et postérieur.

La position du NCC est mesurée à la fin de l'étape de centration/rotation lorsque le complexe atteint sa position la plus antérieure. Elle est calculée comme étant le centre d'une

droite tracée entre le centre de l'aster antérieur et le centre de l'aster postérieur. Comme précédemment les positions sont normalisées en pourcentage de la longueur et de la largeur de l'embryon. 0% correspondant au pôle antérieur et 100% au pôle postérieur.

V.D.2. Tracking Automatique

Une macro a été développée sous Image J par David Cluet (LBMC) afin de suivre de manière automatique les centrosomes d'un embryon lors de la première division asymétrique sur des films en DIC. Voir Résultats - Chapitre 4.

VI. Production d'anticorps

Nous avons essayé de produire un anticorps polyclonal contre deux peptides conservés de Ce-GPR-1/2 et Cbr-GPR-2. Cbr-GPR-2 ne partageant que 67% de similarité en acides aminés avec Ce-GPR-1/2, il est impossible de détecter Cbr-GPR-2 avec un anticorps dirigé contre Ce-GPR-1/2. Eurogentec réalisa la production des peptides et l'immunisation des lapins. Le sérum d'un lapin révéla un fort signal correspondant à ce qui est attendu au niveau de la localisation de GPR sur des embryons fixés (1 :50). Étonnamment, aucun signal n'a été détecté pour des embryons fixés de *C. elegans* ni en western blot (voir Riche *et al.*, 2013).

De la même manière deux peptides conservés entre Ce-LIN-5 et Cb-LIN-5 ont été utilisés pour la même procédure chez Eurogentec (aa 775-789 : C+PSGDEENVRRGGAAG et aa 191-205 : C+LRTATSTARRSPIAE). Aucun signal n'a été détecté sur embryons fixés de *C. elegans* ou de *C. briggsae*.

Nous avons ensuite essayé de faire un anticorps anti-Ce-GPR1/2. Ce-GPR-1 a été cloné dans le plasmide pGEX6P3 qui contient la séquence de la GST, puis le plasmide a été utilisé pour transformer des bactéries BL21 afin de produire les protéines GST-Ce-GPR-1. Les protéines ont été synthétisées en culture puis purifiées sur FPLC ÄKTA Purifier sur colonne GSTrap HP 1-ml (17-5281-01, GE Healthcare). Seul Ce-GPR-1 fut récupérée en quantité suffisante et 900µg de la protéine dans un tampon PBS 1X, 10% Glycérol fut envoyé à Eurogentec pour immuniser des lapins. Aucun des deux sera produits ne donna de signal sur des embryons fixés de *C. elegans*.

VII. Marquage par Immunofluorescence

VII.A. Fixation

Une trentaine de vers adultes gravides sont coupés dans une goutte d'eau déposée sur une lame recouverte de poly-L-lysine qui permet l'adhérence des vers et des embryons libérés sur la lame. Les embryons sont recouverts d'une lamelle et l'excédent d'eau est éliminé avec du papier buvard pour les aplatir. Les lames sont déposées rapidement sur un bloc d'aluminium afin de congeler les embryons tout en les préservant physiquement. La lamelle est ensuite « craquée » afin de décoller la cuticule des embryons et permettre la pénétration des anticorps. Les lames sont enfin baignées dans du méthanol à -20°C au moins 5 minutes pour fixer les embryons.

VII.B. Marquage

Les lames sont rincées dans du Phosphate-Buffer Saline (PBS) 1X et dans du PBS-Tween 0,05 % (PBT). Les lames sont ensuite marquées avec un anticorps primaire puis un anticorps secondaire pendant 45 minutes à température ambiante dans une chambre noire humide (avec une série de rinçage entre les deux). Enfin les embryons sont recouverts d'un milieu de montage puis d'une lamelle qui est ensuite scellée. Les lames sont conservées à 4°C.

Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : un anti-Ce-GPR-1 (1:50) fait dans le lapin (Park and Rose, 2008), un antiserum-Cb-GPR-2 (1 :50) fait dans le lapin (Eurogentec), un anti-GFP fait dans le lapin (1:500) (A6455, Invitrogen), un anti-tubuline fait dans la souris (1:100) (T6199, DM1A, Sigma), un anti-PGL-1 (1 :20) fait dans le lapin (donné par Susan Strome). Les anticorps secondaires utilisés sont: un anti-souris conjugué au DylightTM488 fait dans l'âne (715-485-151, Jackson ImmunoResearch laboratory) (1:1000), un anti-lapin conjugué au DylightTM488 fait dans l'âne (715-485-152, Jackson ImmunoResearch laboratory) (1:1000), un anti-souris conjugué au Cy3 (715-165-150, Jackson ImmunoResearch laboratory) (1:1000), et un anti-lapin conjugué au Cy3 (711-165-152, Jackson ImmunoResearch laboratory), (1:1000). L'ADN est révélé avec du Hoechst (33342, Sigma).

VII.C. Quantification du niveau cortical de GPR

La quantification de GPR est faite à partir d'une seule image issue du confocal à un plan médian de l'embryon. Seuls les embryons unicellulaires au stade métaphase tardive ou anaphase sont utilisés pour l'analyse, le domaine de GPR étant plus étendu en télophase.

Sous ImageJ, une ligne de 5 pixels de large est dessinée le long du cortex. Elle commence au milieu du pôle antérieur (0% de la longueur de l'embryon (EL) et 200% EL), et fait tout le tour de l'embryon. Le milieu du pôle postérieur correspond à 100% EL. L'intensité des pixels est ensuite mesurée avec la fonction « Plot profile ». Sous Image J un masque de l'embryon a été dessiné puis utilisé sous Matlab pour détecter le contour de chaque embryon. Ces données sont utilisées pour calculer les coordonnées barycentriques de l'embryon et projeter ses axes long et transverse. Ce référentiel permet de convertir les coordonnées 2D des données de contour de GPR en pourcentage par rapport à la longueur de l'embryon. Pour chaque embryon, les moitiés corticale supérieure et inférieure sont traitées séparément car elles présentent souvent des profils différents.

Pour mesurer le ratio A/P des niveaux de GPR pour des embryons en prophase, nous avons quantifié l'intensité des pixels dans une large région cytoplasmique identique dans les deux espèces.

VIII. Western Blot

La lignée GFP::Cbr-GPR-2 (ANA035) à été synchronisée et les larves L3 on ensuite été nourries pendant 48 heures sur des boites NGMensemencées de bactéries exprimant *Cbr-Gβ* dbARN, un RNAi de control (*C. elegans unc-22*) ou sur des boites NGM control. Un extrait embryonnaire a été préparé à partir de ces vers et chargé sur gels SDS-page. Après transfert sur membrane de nitrocellulose un anticorps anti-tubuline fait dans la souris (1:2000) (T6199, DM1A, Sigma) est utilisé comme gène de charge. Un anticorps monoclonal anti-GFP fait dans la souris (Roche) (1:1000) est utilisé pour détecter le niveau total de GPR. Les anticorps primaires dilués dans du PBT-Lait (PBS 1X, 5% Lait, 0,01% Tween-20) et incubés toute la nuit à 4°C. L'anticorps secondaire est un anti-souris conjugué ECL-HRP fait dans le mouton (NA931, GE Healthcare) (1:5000). Il est également dilué dans du PBT-Lait et incubé à température ambiante pendant 40 minutes. Le Kit de révélation SuperSignal West Pico Chemiluminescent est l'ECL West Pico (34087, Thermo Scientific).

Les lignées GFP::Ce-gpr-2 dans Cb (ANA097) et GFP::Cb-gpr-2 dans Ce (ANA064) ont été amplifiées sur NGM-OP50 concentrées quatre fois. Un maximum d'adultes gravides a été récolté pour préparer des extraits embryonnaires qui ont été chargés sur gels SDS-page. Comme précédemment un transfert sur membrane de nitrocellulose a été réalisé et les mêmes anticorps primaires et secondaires ont été utilisés mais à des concentrations différentes. L'anticorps primaire anti-tubuline a été utilisé au (1:2000) et l'anti-GFP au (1:200). L'anticorps secondaire anti-souris a été utilisé au (1:2000). Le même kit de révélation a été utilisé.

IX. Double hybride

La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* Y8930 a été utilisée pour l'analyse double hybride. Cette souche nous a été donnée par l'équipe de Sander van den Heuvel ainsi que les sept lignées contrôles.

La souche Y8930 a été cotransformée avec les plasmides appât et les plasmides proie puis les colonies contenant les deux plasmides ont été sélectionnées sur milieu gélosé sans leucine ni tryptophane (SD-LW).

Chaque souche contenant une combinaison d'un plasmide appât et d'un plasmide proie ainsi que les sept souches contrôles sont utilisées pour faire des cultures o/n en milieu liquide SD-LW. Chaque culture est ensuite diluée à DO=0,1 puis 20 µL sontensemencés en goutte sur différents milieux sélectifs : SD-LWAdénosine (SD-LDAdé), SD-LWHistidine (SD-LWH), ainsi que des milieux SD-LWH additionnée de 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT). Le 3-AT est un inhibiteur compétitif du produit du gène HIS3 et implique que la levure doit augmenter son niveau d'expression du gène HIS3 afin de survivre. Ceci permet de vérifier la force de l'interaction testée. Les concentrations de 3-AT sont les suivantes : 1mM, 2mM, 5mM et 10mM. Les levures sont ensuite incubées pendant 3 jours à 30°C.

X. Statistiques

Tous les tests statistiques ont été réalisés sur Excel grâce à l'outil "Utilitaire d'Analyse".

Un seul test a été utilisé: le test t de Welch correspondant à un test d'égalité des espérances dans le cas où les variances sont différentes. Tous les tests sont bilatéraux avec un risque alpha = 5%.

RÉSULTATS/ DISCUSSIONS

Chapitre 1: Les embryons de *C. briggsae* révèlent un contrôle positionnel des oscillations du fuseau mitotique évolutivement conservé.

I. Introduction

La division asymétrique est un mécanisme que l'on pense être fortement contraint. En effet la finalité de cette division permettant la diversité cellulaire et ainsi le développement d'un organisme complet à partir d'une cellule unique, celle-ci doit être strictement régulée. Nous avons vu dans le chapitre précédent que la grande majorité des protéines nécessaires aussi bien à la polarisation (qu'elle soit antéro-postérieure ou apico-basale) qu'au positionnement du fuseau, sont très conservées entre les différents organismes étudiés. En revanche chaque organisme et/ou chaque type cellulaire ajoute à la régulation de ces protéines une complexité qui lui est propre. Il est donc parfois difficile de faire des parallèles entre les organismes malgré la conservation générale du processus. C'est pourquoi il faut comparer des espèces proches morphologiquement et phylogénétiquement si l'on veut comprendre comment un système évolue (Haag, 2014). Nous avons alors choisi de comparer la division asymétrique de l'embryon précoce de *C. elegans* avec celle d'une espèce évolutivement proche : *C. briggsae*.

L'analyse des mouvements des pronoyaux et du fuseau mitotique observés au cours de la première division embryonnaire reflète l'action des forces mécaniques exercées lors du positionnement du fuseau. Nous avons identifié que les mouvements observés chez *C. briggsae* lors de cette première division de l'embryon étaient différents de *C. elegans*, bien que générant également deux cellules filles différentes en taille et en devenir. Ceci suggère que les forces mécaniques mises en jeu sont régulées différemment entre espèces. Nous avons vu en introduction que la processivité des moteurs intervenant lors de la première division augmente au cours du temps et qu'elle est proportionnelle à la courbe de déplacement du fuseau mitotique (Pecreaux et al., 2006). Ainsi, par l'analyse de la courbe de déplacement du fuseau mitotique de *C. briggsae*, il est déjà possible d'identifier si la processivité est un paramètre qui varie entre les deux espèces. Si la processivité varie ceci suggèrera que les phénotypes variables entre *C. elegans* et *C. briggsae* peuvent s'expliquer par une régulation différente des générateurs de force. Nous avons également vu que *gpr* est un gène dose-dépendant et que la quantité de protéine totale influence le déplacement

et les oscillations du fuseau (Pecreaux et al., 2006; Redemann et al., 2010). Du fait de la duplication de gène qu'il y a chez *C. elegans* pour *gpr* et qu'il n'y a pas chez *C. briggsae*, nous avons fait l'hypothèse qu'une quantité différente de cette protéine était à l'origine des phénotypes observés. De plus, les protéines GPR et LIN-5 sont assez mal conservées en séquence d'acides aminés entre ces espèces proches (Figure 31). Nous avons également fait l'hypothèse qu'en plus de la différence de quantité de protéine totale de GPR, des divergences de séquence de ces protéines pouvaient entraîner des changements de régulation du complexe générateur de force expliquant les différents mouvements observés.

Nous avons donc analysé la première division des embryons de *C. elegans* et de *C. briggsae* dans le but : 1) d'améliorer notre compréhension sur le processus de positionnement du fuseau mitotique, 2) d'identifier des paramètres du système qui ont évolué. Nous avons pour cela étudié plusieurs souches naturelles de chacune des espèces, mais aussi une lignée de *C. elegans* mutées pour l'une des deux copies de *gpr* et une lignée de *C. briggsae* surexprimant son propre gène *Cbr-gpr-2*. Nous avons également utilisé des inactivations de gènes par RNAi pour moduler la localisation de Cbr-GPR-2 dans des embryons de *C. briggsae*. Ces travaux ont mené à la publication d'un article (ci-joint à ce chapitre) en 2013. Les principaux résultats et conclusions de cet article sont résumés ci-après.

II. Résultats

Il a été montré dans l'équipe que l'inactivation par RNAi des gènes *Cbr-Gα*, *Cbr-gpr-2* et *Cbr-lin-5* présentaient les mêmes phénotypes que l'inactivation de leurs orthologues chez *C. elegans* : une absence de déplacement du fuseau mitotique, une absence des oscillations transverses et une division cellulaire symétrique. Il apparaît donc que ces gènes sont aussi responsables de la génération des forces de traction chez *C. briggsae*. Ainsi comme chez *C. elegans*, chez *C. briggsae* lors de la première division embryonnaire, le fuseau mitotique va se positionner en réponse à la polarité cellulaire et ce via le complexe précédemment introduit : Gα/GPR/LIN-5.

Cette division a été filmée en optique DIC et les mouvements des centrosomes au cours du temps ont été analysés dans les deux espèces. Nous avons montré qu'en prophase, chez *C. briggsae*, les pronoyaux migrent plus loin dans l'hémisphère antérieur de l'embryon (nous avons appelé cette différence "overcentration"), par conséquent le fuseau formé en métaphase est plus antérieur que celui de *C. elegans*. Lors de l'anaphase, les oscillations du fuseau mitotique générées par les forces de traction sont fortement diminuées. De plus, le démarrage des oscillations est retardé de 30s par rapport à l'anaphase contrairement à *C. elegans* ce qui engendre une durée des oscillations plus courte. Malgré ces différences, la position finale des centrosomes est identique conduisant à la formation de deux cellules filles de taille et de devenir différents.

II.A. Une position intracellulaire critique dicte le démarrage des oscillations du centrosome postérieur dans les deux espèces

Chez *C. briggsae*, du fait de l'overcentration, au début de l'anaphase le fuseau est plus antérieur que celui de *C. elegans*. Or, nous avons observé que dans les deux espèces, le démarrage des oscillations du fuseau s'initie lorsque le centrosome postérieur atteint une position qui correspond à 70% de la longueur de l'embryon. Nous avons alors émis l'hypothèse que le décalage de position du fuseau pouvait être à l'origine du délai en temps du démarrage des oscillations, et qu'il fallait donc plus de temps pour le fuseau de *C. briggsae* (qui est plus antérieur) pour atteindre la position critique d'oscillation. Pour éprouver cette hypothèse, nous avons forcé le fuseau à être plus au postérieur en anaphase chez *C. briggsae* par une technique d'ablation laser des microtubules astraux antérieurs.

Effectivement le démarrage des oscillations se fait plus tôt mais la position à laquelle ces oscillations débutent est restée inchangée. Étonnement, nous avons constaté que lorsque les oscillations démarrent plus tôt dans ce contexte expérimental, elles deviennent plus fortes en amplitude, suggérant que l'amplitude maximum des oscillations dépend du temps passé dans la phase d'oscillation. Ces expériences ont mis en évidence qu'il y a un point de contrôle spatial dans l'embryon qui contraint le démarrage des oscillations du fuseau et que celui-ci est conservé entre les espèces.

II.B. Le contrôle spatial du démarrage des oscillations corrèle avec la limite postérieure du domaine GPR

Dans un premier temps nous avons émis l'hypothèse que le point de contrôle pour le démarrage des oscillations pouvait être défini par une contrainte physique, déclenchée par exemple par une courbure spéciale au niveau du cortex postérieur. En effet, nous avons mesuré la courbure des embryons des deux espèces, et constaté qu'un changement de courbure s'opérait aux alentours des 70% de la longueur de l'embryon. Toutefois, il est connu que dans des embryons entièrement ronds suite à la digestion de leur cuticule, le fuseau oscille comme dans un embryon de forme oblongue (Tsou et al., 2002). Or dans ces embryons il n'y a pas de changement de courbure indiquant que le signal activant les oscillations est indépendant de la forme de l'embryon.

Chez *C. elegans*, il est également connu que la limite postérieure du croissant cortical de Ce-GPR-1/2 se situe à 70% de la longueur de l'embryon (Park and Rose, 2008). Notre seconde hypothèse était alors que la limite du domaine cortical de GPR pouvait contrôler le démarrage des oscillations. Grâce à un programme informatique Matlab mis au point en collaboration avec Françoise ARGOUL (Laboratoire de Physique, Lyon), j'ai pu corrélérer la quantification du signal cortical de GPR avec la longueur en % de l'embryon et sa courbure dans les deux espèces. L'analyse de la localisation de GPR sur des embryons immunofixés a montré que la limite du domaine postérieur de cette protéine corrèle avec la position qui contrôle le démarrage des oscillations, soit 70% de la longueur de l'embryon.

II.C. La limite postérieure du domaine de GPR contrôle le démarrage des oscillations

Nous avons confirmé cette corrélation en modifiant le domaine de GPR. Pour cela nous avons inhibé des protéines qui régulent négativement la localisation corticale de GPR, à savoir la sous-unité G β des protéines hétérotrimériques G ainsi que la protéine à domaine DEP LET-99. Dans ces lignées, GPR est localisée tout autour du cortex et nous avons observé que la position de démarrage des oscillations est beaucoup plus antérieure et les oscillations commencent donc avant le début de l'anaphase. Ces résultats ont confirmé que le point de contrôle du démarrage des oscillations est bien dépendant de la limite postérieure du domaine de GPR établi en anaphase.

II.D. Le niveau de GPR et la durée des oscillations contrôlent l'amplitude des oscillations

Sachant que *C. briggsae* possède une copie du gène *gpr* alors que *C. elegans* en possède deux, nous avons ensuite observé l'effet d'une surexpression de *gpr* dans des embryons *C. briggsae*, ainsi que des lignées mutantes de *C. elegans* n'exprimant qu'une seule copie de *gpr*. Pour ces lignées, les limites du domaine cortical postérieur de GPR et par conséquent la position ainsi que le timing de démarrage des oscillations sont inchangés par rapport aux souches sauvages. En revanche, l'amplitude des oscillations est augmentée lorsque *C. briggsae* surexprime *gpr* et est diminuée lorsque *C. elegans* n'exprime qu'un seul gène *gpr*. Ces résultats ont donc montré qu'en plus de la durée des oscillations, le niveau de GPR dans le domaine postérieur influe sur l'amplitude des oscillations.

II.E. Le pool antérieur de GPR est responsable de l'overcentration en prophase mais est inactif en anaphase chez *C. briggsae*

Enfin nous avons montré que chez *C. briggsae* le complexe G α /GPR/LIN-5 est responsable de l'overcentration et GPR est plus enrichie à l'antérieur en prophase que chez *C. elegans*.

Cependant, si la protéine GPR-2 de *C. briggsae* est plus enrichie à l'antérieur pourquoi les oscillations antérieures sont aussi réduites? Pour répondre à cette question nous avons inactivé la protéine de polarité PAR-2 (postérieure) dans les embryons de

C. briggsae. Ceci conduit alors à une "antériorisation" de la totalité du cortex. Ces embryons présentent toujours une overcentration indiquant que les forces sont bien actives en prophase. En revanche, en anaphase il n'y a plus d'oscillation à l'antérieur comme au postérieur de la cellule, l'élongation du fuseau est diminuée et la division est symétrique ce qui indique une absence de forces de traction. Nous en avons donc conclu que dès l'entrée en anaphase le pool de Cbr-GPR-2 est inactif à l'antérieur de la cellule.

Ainsi, chez *C. briggsae*, l'enrichissement antérieur de GPR en prophase corrèle avec l'overcentration des pronoyaux. En anaphase, du fait du contrôle spatial du domaine postérieur de GPR, les oscillations démarrent plus tard. Un niveau plus faible de GPR dans le domaine postérieur couplé à une durée d'oscillation plus courte serait à l'origine des oscillations plus faibles du fuseau dans les embryons de *C. briggsae* par rapport à *C. elegans*.

Par cette approche comparative novatrice nous avons montré qu'un processus très conservé tel que le positionnement du fuseau peut présenter des changements cryptiques suite à l'évolution des systèmes. Ce travail, dont je suis premier auteur a été publié dans *The Journal of Cell Biology* en mars 2013.

Ces travaux ont révélé qu'une protéine essentielle telle que GPR pouvait être régulée différemment entre deux espèces proches. Nous avons souhaité par la suite exploiter ces différences évolutives pour mieux comprendre le mode de régulation de la protéine GPR.

Evolutionary comparisons reveal a positional switch for spindle pole oscillations in *Caenorhabditis* embryos

Soizic Riche,¹ Melissa Zouak,¹ Françoise Argoul,² Alain Arneodo,² Jacques Pecreaux,³ and Marie Delattre¹

¹Laboratory of Molecular Biology of the Cell, UMR5239, and ²Laboratory of Physics, UMR5672, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Centre National de la Recherche Scientifique, 69007 Lyon, France

³Institute of Genetics and Developmental Biology, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR6290, University of Rennes 1, 35043 Rennes, France

During the first embryonic division in *Caenorhabditis elegans*, the mitotic spindle is pulled toward the posterior pole of the cell and undergoes vigorous transverse oscillations. We identified variations in spindle trajectories by analyzing the outwardly similar one-cell stage embryo of its close relative *Caenorhabditis briggsae*. Compared with *C. elegans*, *C. briggsae* embryos exhibit an anterior shifting of nuclei in prophase and reduced anaphase spindle oscillations. By combining physical perturbations and mutant analysis in both species, we show

that differences can be explained by interspecies changes in the regulation of the cortical $G\alpha$ -GPR-LIN-5 complex. However, we found that in both species (1) a conserved positional switch controls the onset of spindle oscillations, (2) GPR posterior localization may set this positional switch, and (3) the maximum amplitude of spindle oscillations is determined by the time spent in the oscillating phase. By investigating microevolution of a subcellular process, we identify new mechanisms that are instrumental to decipher spindle positioning.

Introduction

The first embryonic asymmetric division of the nematode *Caenorhabditis elegans* has been essential to reveal the biophysical and molecular mechanisms controlling nuclei and spindle positioning (Gönczy, 2008). In *C. elegans* and in many other nematode species, the mitotic spindle is asymmetrically localized at the end of the first cell cycle, giving rise to a small posterior cell and a large anterior cell after cytokinesis (Brauchle et al., 2009). In a preliminary study, we found that spindle trajectories inside the cell differed between species and from those observed in the reference species *C. elegans*. In this work, we used the differences found in one of *C. elegans* closest known relatives, *Caenorhabditis briggsae*, as variant phenotypes to further explore the mechanisms of nuclei and spindle positioning.

In *C. elegans*, pronuclei meet at the posterior end of the cell after fertilization. During prophase, unbalanced pulling forces act on the astral microtubules, leading to the centration and rotation of the assembled nuclei-centrosome complex (NCC) along the anterior/posterior (A/P) axis of the cell

(Labbé et al., 2004; Kimura and Onami, 2005). At the onset of mitosis, cortical-force generators pull on the astral microtubules with stronger forces toward the posterior pole (Grill et al., 2001; Labbé et al., 2004; McCarthy Campbell et al., 2009). During anaphase, therefore, the spindle is posteriorly displaced and undergoes transverse oscillations, whose amplitude reflects the strength of these pulling forces (Pecreaux et al., 2006; Redemann et al., 2011).

Proteins involved in cortical pulling forces form a complex that is functionally conserved from worms to mammals to control spindle positioning (Werts et al., 2011). In *C. elegans*, this complex contains the G protein $G\alpha$ subunit, which is anchored to the cortex. $G\alpha$ binds the G protein regulators GPR-1 and GPR-2 (referred to as GPR-1/2), which bind the NuMA homologue, LIN-5. LIN-5 interacts with the minus end-directed motor dynein. The anchoring of dynein to the cortex via this ternary complex, in conjunction with depolymerizing astral microtubules, is thought to generate pulling forces (Gönczy, 2008). GPR-1/2 and LIN-5 are found at the cortex and show a

M. Zouak and F. Argoul contributed equally to this paper.

Correspondence to Marie Delattre: marie.delattre@ens-lyon.fr

Abbreviations used in this paper: A/P, anterior/posterior; DIC, differential interference contrast; NCC, nuclei-centrosome complex; NEBD, nuclear envelope breakdown.

© 2013 Riche et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons license (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2013/05/16/jcb.201210110.DC1.html>

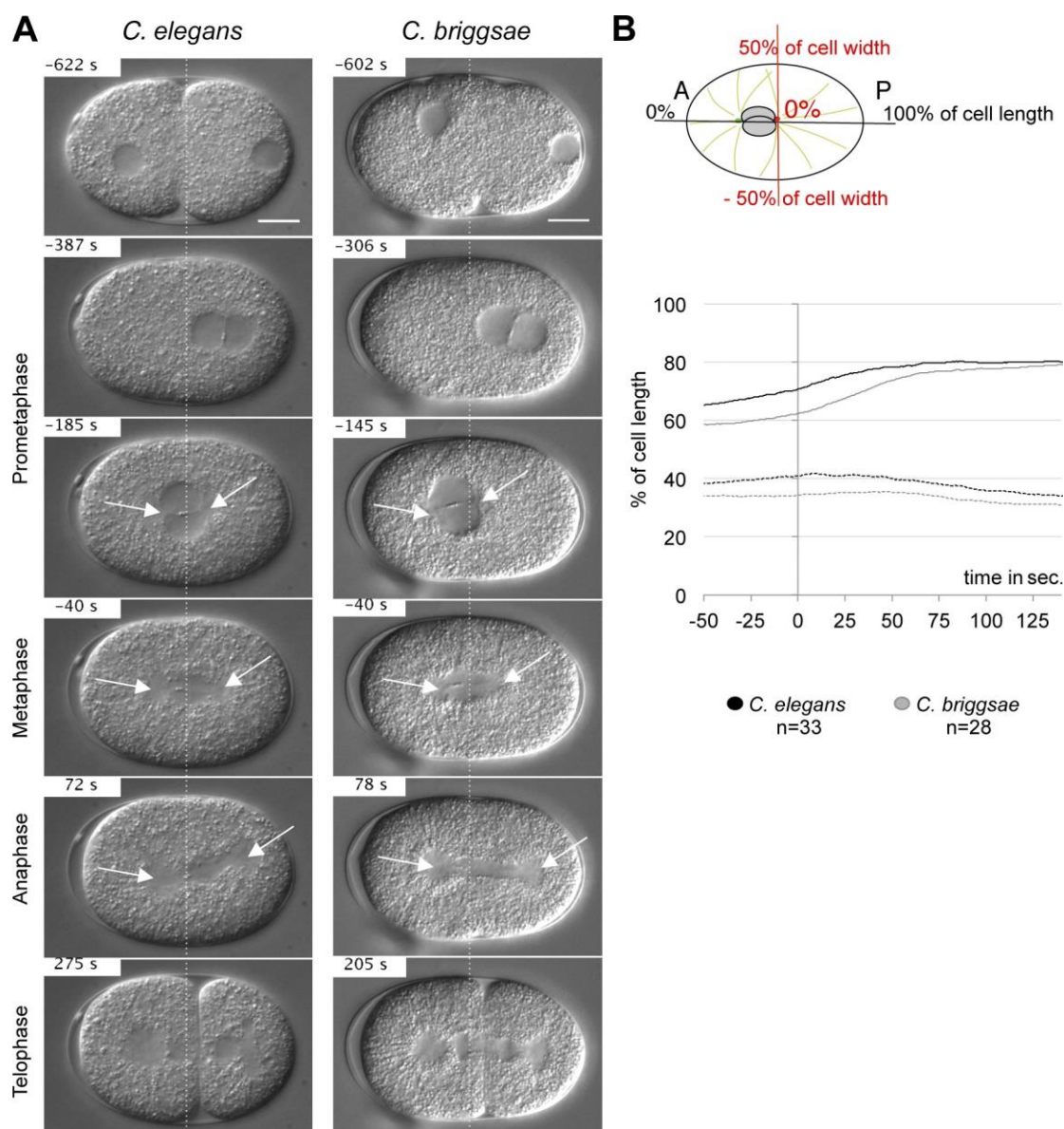


Figure 1. **The first asymmetric division in *C. elegans* and *C. briggsae* embryos.** (A) Snapshots from DIC recordings of *C. elegans* and *C. briggsae* wild-type strains. Time is shown relative to anaphase onset (t = 0 s). Anterior is to the left. Broken lines are positioned at 50% of embryo length. Arrows show the asters. Bars, 10 μ m. (B) Drawing of a one-cell stage embryo. The horizontal axis corresponds to the A/P axis: 0% defines the anterior pole of the cell. The transverse axis is in red: 0% is the center of the cell. On the bottom panel, the mean position of the centrosome along the A/P axis is shown relative to anaphase onset (t = 0 s) for both species. -50 s corresponds to metaphase and 125 s to cytokinesis onset. Solid and broken lines represent the posterior and anterior centrosomes, respectively.

slight enrichment at the anterior cortex during NCC centration/rotation and at the posterior cortex during mitosis (Colombo et al., 2003; Gotta et al., 2003; Park and Rose, 2008). Thus, the dynamic localization of GPR-1/2/LIN-5 correlates with the direction of forces throughout the cell cycle and may reflect the position of active force generators. However, inactivation of G α or GPR-1/2 slows down but does not prevent NCC centration in *C. elegans* (Goulding et al., 2007; Park and Rose, 2008), which suggests that mechanisms independent of the ternary complex act in parallel to position the NCC in the cell center. Such mechanisms involve cortical dynein-dependent gliding of microtubules or cytoplasmic dynein pulling along microtubule length (Gusnowski and Srayko, 2011; Kimura and Kimura, 2011).

We found two main differences in spindle trajectories between *C. elegans* and *C. briggsae* embryos that may reflect differential regulation of intracellular forces. We explored these phenotypes using a combination of physical perturbation of the mitotic spindle and analysis of mutant or RNAi phenotypes in both species.

Results and discussion

NCC and spindle positioning differ between *C. elegans* and *C. briggsae* embryos

To analyze nuclei and spindle movements of both *C. elegans* N2 and *C. briggsae* JU1018 strains, we tracked the position of both

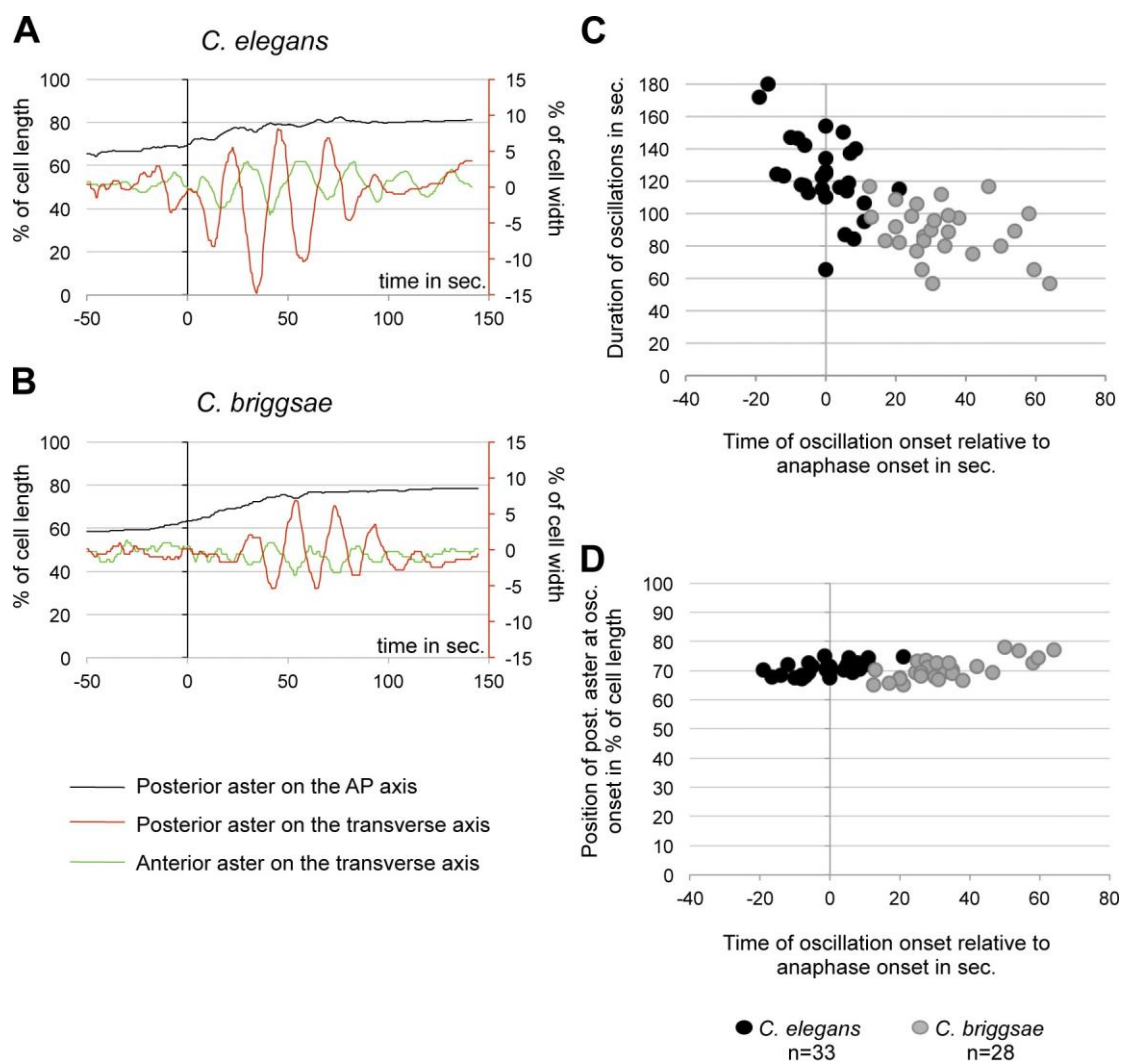


Figure 2. **Spindle oscillations differ between *C. elegans* and *C. briggsae* embryos.** (A and B) Centrosome displacement on the A/P (y axis on the left) and transverse axes (y axis on the right) relative to anaphase onset ($t = 0$ s) for one representative embryo per species. The position of the posterior centrosome on the A/P axis is represented by a black curve, while its position on the transverse axis is shown in red. Transverse movements of the anterior centrosome are shown in green. (C) The onset and end of posterior centrosome oscillations were measured manually from graphs of transverse oscillations (see A and B). Oscillation duration for each embryo is represented relative to the time at oscillation onset (in seconds from anaphase onset). (D) The position of the posterior centrosome in percentage of cell length at the beginning of oscillation is plotted versus the time at oscillation (in seconds from anaphase onset).

asters over time from differential interference contrast (DIC) recordings. Although the NCC formed at the posterior side of the cell in both species, it was systematically displaced beyond the center of the cell in *C. briggsae* embryos. Because of this “overcentration,” the metaphase spindle formed more anteriorly in *C. briggsae* than in *C. elegans*. At the end of anaphase, however, the posterior spindle pole reached the same final position in both species (as a percentage of total cell length; Fig. 1, A and B; Videos 1 and 2; and Table S1).

Another important difference between these species involved the spindle oscillations during anaphase. Although the frequency of oscillations was similar between species, we found a strong diminution in oscillation amplitude for both centrosomes in *C. briggsae* embryos compared with *C. elegans* (Fig. 2, A and B; and Table S1). Moreover, the spindle began to oscillate at anaphase onset in *C. elegans* embryos, whereas it started 30 s later in *C. briggsae* embryos. As oscillations ended at the same time

in both species, they lasted 30 s less in *C. briggsae* than those in *C. elegans* (Fig. 2 C and Table S1). We also found a correlation between oscillation onset and a specific position of the posterior centrosome along the A/P axis, corresponding to $\sim 70\%$ of embryo length in both species and in *C. elegans* embryos with genetically altered size (Fig. 2 D, Fig. S1 A, and Table S1).

We then repeated the same measurements using two other *C. elegans* and *C. briggsae* strains. We confirmed that the observed spindle trajectories were not strain-specific but rather reflected a consistent interspecies divergence (Table S1).

Because *C. briggsae* is more frequently found in tropical regions and can grow at higher temperatures than *C. elegans* (Dolgin et al., 2008), we grew and recorded *C. briggsae* animals at 28°C. These embryos still exhibited different spindle trajectories compared with *C. elegans* embryos raised at 23°C (Table S1). For these cellular processes, therefore, differences between species do not result from thermal adaptations of *C. briggsae* animals.

The position of the posterior centrosome dictates oscillation onset in both species

We first investigated the conserved correlation between oscillation onset and position of the posterior centrosome along the A/P axis. We tested the existence of a positional control for oscillation onset. Because the posterior centrosome was located at 62.9% at anaphase onset in *C. briggsae* embryos, the oscillation delay found in this species could result from the time it took the posterior centrosome to reach 70% (in *C. elegans* the posterior centrosome was already located at 70.9% at anaphase onset; Table S1). Alternatively, the time delay observed in oscillation onset could reflect a delay in the activation of cortical force generators between species.

To determine whether spindle oscillations are temporally or spatially controlled, we forced the mitotic spindle of *C. briggsae* embryos to reach 70% of cell length earlier in the cell cycle. To this end, anterior astral microtubules were severed using a laser microbeam at the end of prometaphase (Fig. 3, A and B; and Video 3). For experiments performed around nuclear envelope breakdown (NEBD), microtubule severing had only a mild effect on spindle displacement. Cuts performed after NEBD, however, successfully displaced the mitotic spindle toward the posterior end of the cell. Thus, unbalanced microtubule pulling forces are initiated after NEBD, as previously described for *C. elegans* embryos (Labbé et al., 2004; McCarthy Campbell et al., 2009). After microtubule severing, oscillations began when the posterior centrosome reached $68.9 \pm 1.8\%$ of the embryo's length, regardless of the elapsed time (Fig. 3 C). Oscillation onset, therefore, depends on the position of the posterior centrosome. In addition, oscillations within laser-cut *C. briggsae* embryos lasted longer and exhibited larger amplitudes than wild-type embryos (Fig. 3, D and E). We conclude that: (1) force-generator activity is temporally regulated, (2) a positional switch controls the onset of spindle oscillations, (3) delayed spindle oscillations observed in *C. briggsae* are a consequence of the overcentration phenotype, and (4) the lower amplitude oscillations that characterize intact *C. briggsae* embryos are in part caused by the shorter time spent in the oscillating phase. Precise coordination of oscillation onset and the start of anaphase in *C. elegans* prevented the identification of this positional switch.

GPR posterior localization correlates with the positional switch in both species

In *C. elegans*, the enrichment of GPR/LIN-5 at the posterior cortex corresponds to $\sim 70\%$ of cell length during anaphase (Fig. 4, A and J; Park and Rose, 2008), which suggests that these proteins may set the positional switch for oscillation onset. We asked if *C. briggsae* embryos showed the same pattern of GPR localization.

First, we confirmed that the $G\alpha$ -GPR-LIN-5 complex is functionally conserved in *C. briggsae* embryos. After inactivation of each member of this complex, we found reduced spindle elongation, no spindle displacement, and no spindle oscillations during anaphase, while embryonic polarity was not affected (Fig. S1, B–E; Fig. S2 A; and Video 4). We also showed that the cortical localization of *C. briggsae* GPR-2 (Cbr-GPR-2)

depends on $G\alpha$ proteins, as shown for *C. elegans* embryos (Fig. S2, B–D). Last, we performed laser microsurgery of the central spindle during anaphase (Grill et al., 2001) and revealed unbalanced pulling forces acting on astral microtubules (Fig. S1 F). Thus, in *C. briggsae* embryos, $G\alpha$ -GPR-LIN-5-dependent asymmetric pulling forces are also involved in spindle positioning and oscillations during anaphase.

Next, we found that Cbr-GPR-2 localization shows dynamic patterns during the first cell cycles (Fig. S2 B). In anaphase embryos, similar to *C. elegans* embryos, levels of cortical Cbr-GPR-2 were low in the cell center while a steep increase was detected around 70% of embryo length (Fig. 4, B and J). In both species, therefore, the enrichment of posterior cortical GPR coincides with the positional switch for oscillation onset.

GPR localization influences the oscillation onset; GPR levels act on oscillation amplitude

In *C. elegans*, GPR acts on anaphase spindle oscillations in a dose-dependent manner (Pecreaux et al., 2006; Redemann et al., 2011). Interestingly, the *C. briggsae* genome contains one *gpr* gene, whereas *C. elegans* has two, which is consistent with having reduced spindle oscillations in *C. briggsae*. We first tested whether the difference in gene copy number is responsible for the different spindle motion observed between species.

We first analyzed *C. briggsae* embryos from the ANA017 line expressing an excess of Cbr-GFP-GPR-2. Although these embryos still exhibited NCC overcentration, anaphase spindle oscillations were closer to *C. elegans* oscillations in amplitude. Reciprocally, *C. elegans* mutants for either *gpr-1* or *gpr-2* displayed smaller transverse oscillations that were similar to *C. briggsae* oscillations in amplitude (Fig. 4 I, Fig. 5 A, and Videos 5 and 6). However, modification of *gpr* gene copy number in both species had no impact on the onset of spindle oscillations, both in position and time (Fig. 4, G and H). Moreover, we did not observe changes in the domain boundary of GPR in these conditions, reinforcing the correlation between GPR localization and oscillation onset. (Fig. 4, C, D, and J). Thus, interspecies changes in GPR levels may only explain the differences observed in the amplitude of oscillations.

To test a direct role of GPR on oscillation onset, we attempted to affect the size of the GPR domain. Although we could not identify experimental conditions leading to a change in position of the GPR transition zone, we analyzed embryos for which GPR decorates the entire cortex. We reasoned that if GPR is present above the centrosomes when cortical motors are turned on, microtubules could be prematurely captured. Consequently, oscillations would be triggered when the spindle is in a more central position. In *C. briggsae* embryos, as in *C. elegans*, we found that GPR invades the entire cortex after removal of the $G\beta$ subunit of heterotrimeric G proteins (Thyagarajan et al., 2011) or the DEP domain protein LET-99 (Tsou et al., 2003; Fig. 4, E and F). Importantly, the onset of spindle oscillations was precocious in time and position in both conditions. We also found increased oscillation amplitude compared with wild-type *C. briggsae*, which is consistent with our previous observation

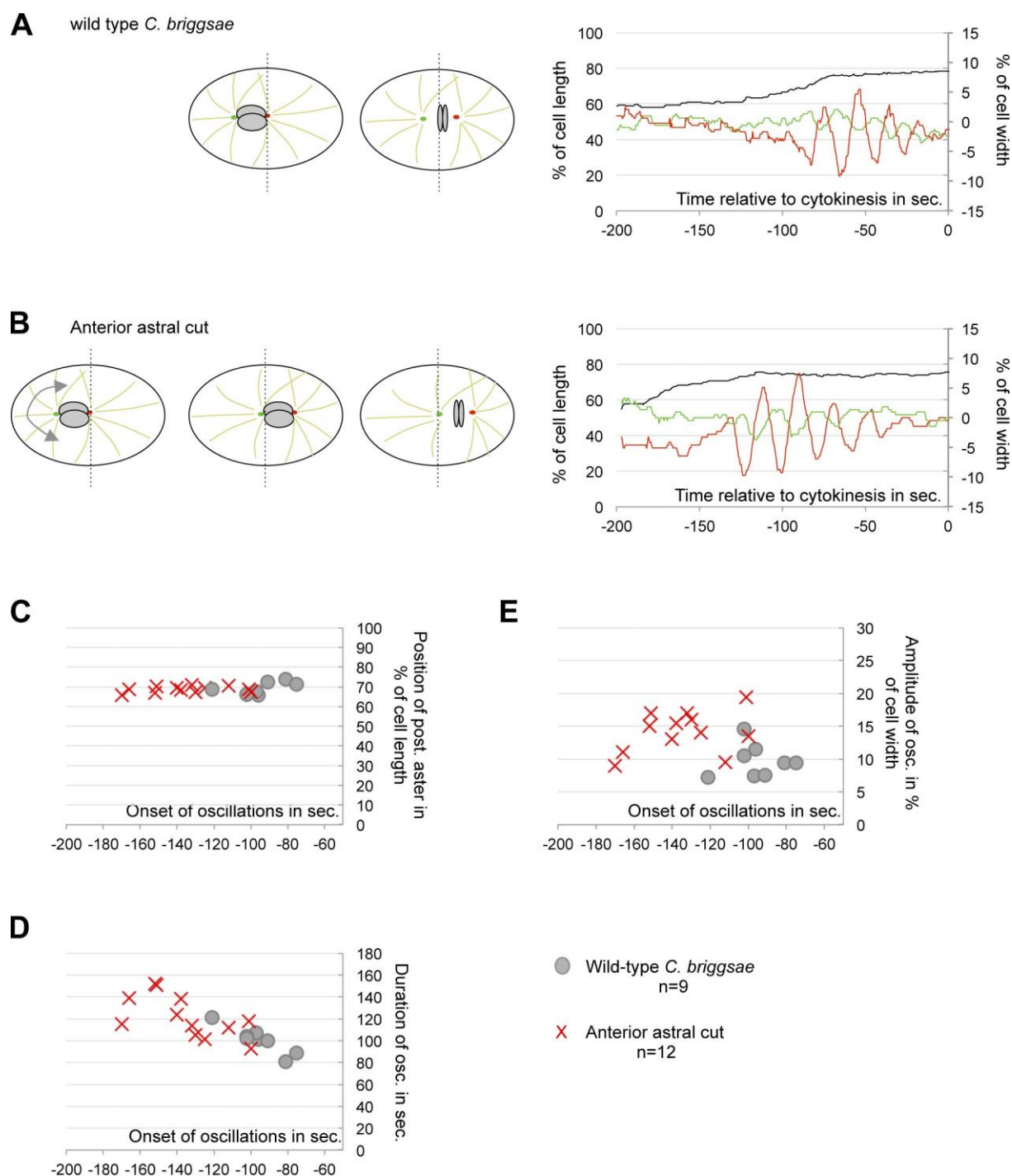


Figure 3. Position-dependent onset of spindle oscillation. (A and B) On the left, drawing of a one-cell stage *C. briggsae* embryo. Nuclei are shown in gray, microtubules in light green, the anterior centrosome in green, and the posterior centrosome in red. The broken line represents the cell center. On the right, the position of the posterior centrosome along the A/P axis (black curve) and the transverse movements of both centrosomes (green and red curves) are shown relative to cytokinesis onset ($t = 0$ s). One representative embryo is shown, among the 9 intact embryos (A) and 12 embryos in which the anterior astral microtubules have been severed (B) that were analyzed. (C–E) From cut and intact embryos, measures of the position of the posterior centrosome at oscillation onset (C), oscillation duration in seconds (D), and maximum amplitude of posterior centrosome oscillations (E) are shown relative to the time at oscillation onset (in seconds to cytokinesis onset).

that earlier oscillation onset allows larger oscillation amplitudes (Fig. 4, G–I; and Videos 7 and 8).

We expected higher oscillation amplitude in *Cbr-Gβ(RNAi)* embryos compared with *Cbr-let-99(RNAi)*, because *Cbr-Gβ(RNAi)* embryos combine high levels of cortical GPR and premature

oscillations onset (Fig. 4, E and F). We found, however, a similar amount of total GPR protein in wild-type and *Cbr-Gβ(RNAi)* embryos (Fig. S2 F), which suggests that despite its cortical accumulation, GPR is still a limiting factor to sustain strong oscillations in *Cbr-Gβ(RNAi)* embryos. To test this hypothesis,

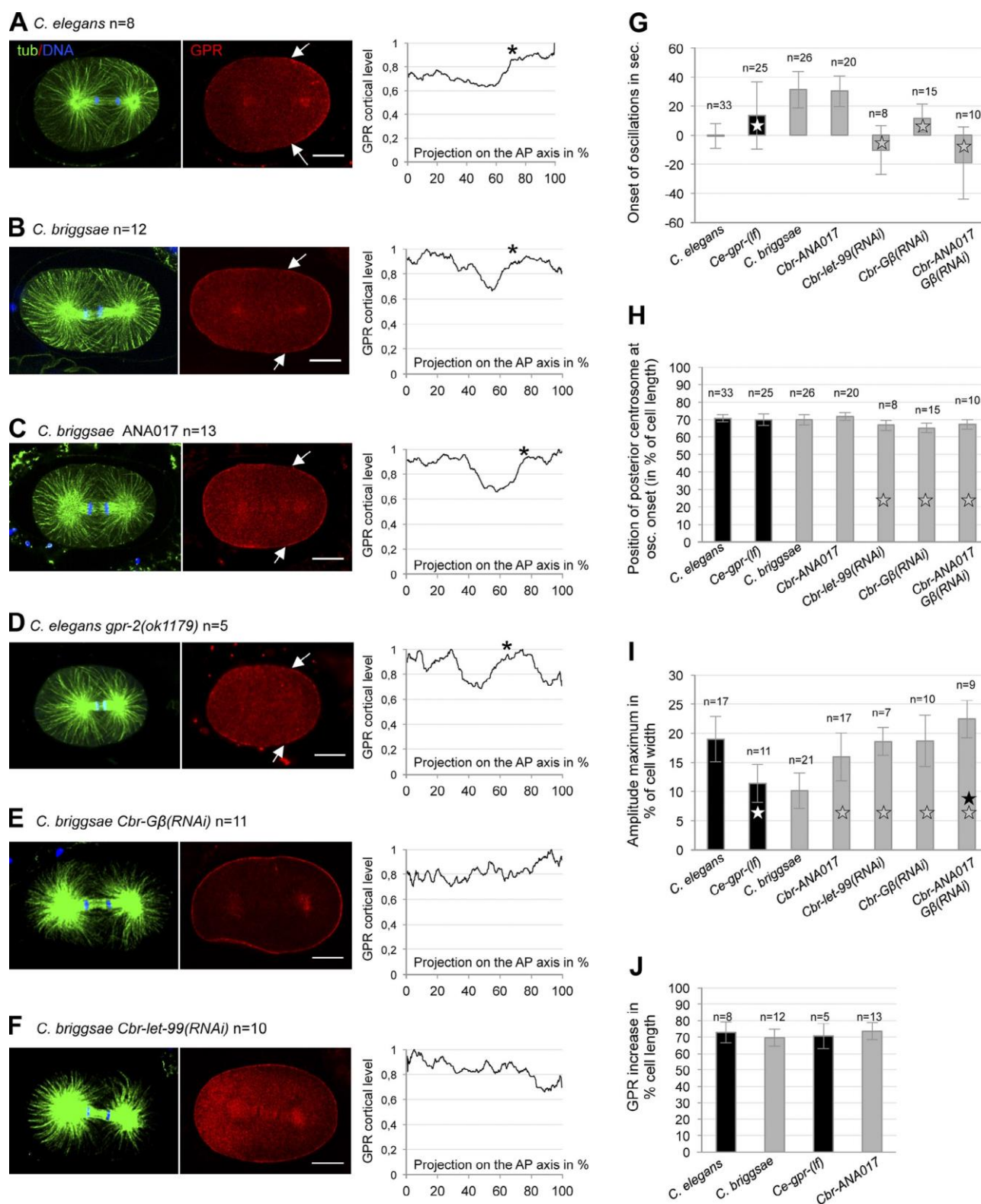


Figure 4. GPR sets the spatial switch for oscillations. (A–F) Plots represent the mean cortical intensity of GPR (from 0 to 1) from *n* anaphase embryos stained with GPR (red), tubulin (green), and DNA (blue) and normalized to the maximum intensity. Values have been projected onto the A/P axis, from the anterior pole (0%) to the posterior pole (100%). The asterisks represent the edge of the posterior plateau. One representative embryo is shown on the left. Anterior is to the left. Arrows show the edge of the GPR posterior domain. Bars, 10 μ m. (G–J) Histograms from analysis of oscillation curves. *Ce-gpr-1(lf)* corresponds to *gpr-1(ok2126)* or *gpr-2(ok1179)* mutant embryos. Statistical differences are shown with white, gray, or black stars for comparison to wild-type *C. elegans*, wild-type *C. briggsae*, or *Cbr-Gβ(RNAi)*, respectively (for $P < 0.05$). Error bars represent standard deviation. The time at posterior centrosome oscillation onset relative to anaphase onset is shown in G, the position of the posterior centrosome at oscillation onset is shown in H, and the maximum amplitude of oscillations is shown in I. (J) Position of the edge of the GPR plateau on the A/P axis was measured from individual graphs of GPR cortical intensities in A–D. Mean values are shown, error bars indicate standard deviation.

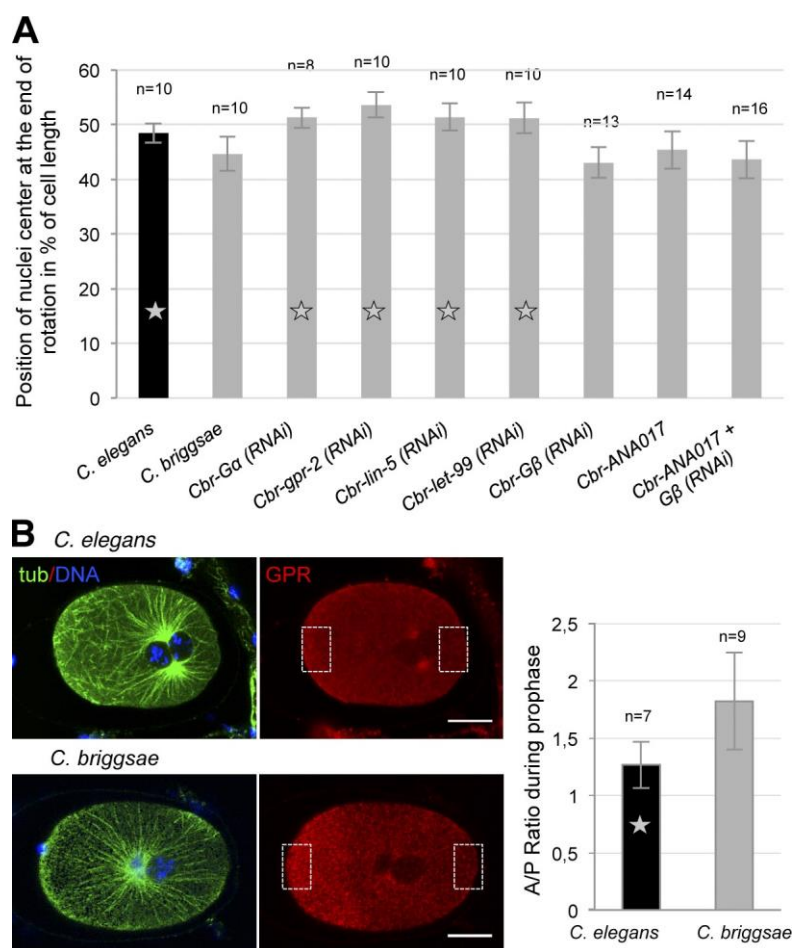


Figure 5. An up-regulation of $G\alpha$ -GPR-LIN-5 leads to NCC overcentration in *C. briggsae* embryos. (A) Position of the center of the NCC at the end of its rotation is represented as a percentage of cell length. Error bars indicate standard deviation. Statistical differences are shown with a star for comparison to wild-type *C. briggsae* (for $P < 0.05$). (B) *C. elegans* and *C. briggsae* embryos during NCC rotation stained with antibodies against GPR (in red). Tubulin is in green and DNA in blue. Rectangles show the region where GPR intensity was measured. The anterior pole is to the left. Bar, 10 μ m. The histogram shows the mean ratio of GPR levels between anterior and posterior side of the cell for each species. Error bars indicate standard deviation. The star shows statistical difference between species ($P < 0.05$).

we treated the ANA017 line showing an excess of GPR with *Cbr-Gβ(RNAi)*. We found a further increase in oscillation amplitude compared with single *Cbr-Gβ(RNAi)* or ANA017 embryos (Fig. 4, G–I). Thus, the increased oscillations found in *Cbr-Gβ(RNAi)* embryos are not caused by an excess of GPR but rather by premature oscillations and expanded GPR domain, as found in *Cbr-let-99(RNAi)* embryos. We confirm, therefore, that the amplitude of oscillations is dependent on the time spent in the oscillating phase as well as the level of available GPR. Overall, we show that the posterior aster starts to oscillate prematurely when GPR is found all over the cortex, which is consistent with a role of GPR in setting the positional switch.

$G\alpha$ -GPR-LIN-5-dependent forces are responsible for NCC overcentration in *C. briggsae* embryos

We finally explored the mechanisms leading to NCC overcentration in *C. briggsae* embryos. In *C. elegans*, down-regulation of GPR or LIN-5 during prophase is needed to prevent NCC overcentration (Galli et al., 2011; Panbianco et al., 2008). We found that inactivation of $G\alpha$, GPR, or LIN-5 by RNAi abolished nuclei overcentration in *C. briggsae* embryos (Fig. 5 A and Fig. S1 B), which suggests that a constitutive up-regulation of the $G\alpha$ -GPR-LIN-5 complex is responsible for NCC overcentration in this species. Importantly, down-regulation of all three proteins restored nuclei centering in *C. briggsae*, which

suggests that mechanisms independent on the ternary complex might, however, be conserved between species to control nuclei centering (Gusnowski and Srayko, 2011; Kimura and Kimura, 2011). Because the different forces responsible for nuclei positioning can be phenotypically uncoupled in *C. briggsae* embryos, their analysis in this satellite species should lead to important findings.

Interestingly, we noticed a strong enrichment of Cbr-GPR-2 in the anterior side of *C. briggsae* embryos during prophase, which persisted throughout the first cell cycle (Figs. 4 B, 5 B, and S2 A). We quantified the A/P ratio of GPR in both species during prophase and found a higher asymmetry toward the anterior pole for *C. briggsae* embryos compared with *C. elegans* (Fig. 5 B). Although this observation is only a positive correlation, we propose that *C. briggsae* embryos are characterized by a lack of $G\alpha$ -GPR-LIN-5 inhibition during prophase, which leads to an accumulation of GPR at the anterior side of the cell and to NCC overcentration.

Despite the anterior accumulation of Cbr-GPR-2, the anterior centrosome undergoes very little oscillation during anaphase and remains almost static in *C. briggsae* embryos (Figs. 1 B and 2 B). We postulated that this anterior GPR pool does not contribute to strong pulling forces during anaphase. To address this question, we inactivated Cbr-PAR-2 protein in *C. briggsae* embryos. In *C. elegans*, *par-2* mutant embryos show an “anteriorization” of the cortex leading to symmetric and weak GPR

cortical recruitment and consequently reduced anaphase pulling forces (Grill et al., 2001). In *Cbr-par-2(RNAi)* embryos, we found symmetric cell division, reduced spindle elongation, and an absence of oscillations, which strongly suggests a reduction of cortical pulling forces (Fig. S1, B–E). However, we found a uniform and strong signal of Cbr-GPR-2 in *Cbr-par-2(RNAi)* embryos at all stages (Fig. S2 D). These results suggest that the anterior pool of Cbr-GPR-2 has a different activity between prophase and anaphase in *C. briggsae* embryos. Cbr-GPR-2 and Ce-GPR-1/2 proteins display only 76% of sequence similarity. Therefore, changes in the protein sequence itself might be responsible for the differences in localization and activation found between species. Identifying these evolutionary changes will be of great interest to decipher the mechanisms of GPR regulation.

Cryptic changes in spindle trajectories behind a conserved positional switch

Our comparative analysis allowed us to uncover a conserved positional switch for spindle oscillation onset. We propose that in both *C. elegans* and *C. briggsae* embryos, the GPR posterior localization sets this positional switch, while the level of GPR within the posterior domain controls the amplitude of transverse oscillations. We also revealed two main evolutionary changes: (1) a differential regulation of GPR during prophase leading to NCC overcentration and consequently to shorter time in the oscillation phase for *C. briggsae* embryos, and (2) a different availability of GPR during anaphase. The diminished transverse oscillations that characterize *C. briggsae* embryos result from a combination of these two differences. With this study, we show that the first cell division of nematode embryos is associated with cryptic changes that can serve to explore essential cellular functions.

How does the positional switch function? It has been previously proposed that spindle oscillations are caused by a gradual increase in processivity of force generators over time (Pecreaux et al., 2006). Our results suggest that although force generators are activated, they are engaged only when the aster is close enough to the domain of force generators, which contain GPR. We reasoned that when asters are far from the GPR domain, few microtubules are long enough to be captured by motors at a given time point. This would lead to aster displacement but be insufficient to trigger oscillations. As the aster gets closer to that domain, enough microtubules may reach the cortex before switching to catastrophe and more motors become progressively engaged.

Although spindle oscillations are instrumental to unravel the mechanisms of microtubule-based forces, they have no inherent function. Why are mechanisms controlling spindle oscillation onset maintained across nematode evolution? A sudden increase in pulling forces may help to rapidly propel the posterior centrosome (and the entire spindle) toward a most posterior position or alternatively to oppose a breaking transversal force to posterior spindle displacement. In any cases, the positional switch could ensure final spindle position and thus asymmetric cell division regardless of initial spindle position and remaining time to cytokinesis.

Materials and methods

Strains

The Bristol N2 *C. elegans* strain was used as the standard wild type. The JU1018 strain, an RNAi-sensitive derivative of the wild-type Indian AF16 strain, was used as the reference for *C. briggsae* (Nuez and Félix, 2012). We found that AF16 and JU1018 have undistinguishable phenotypes concerning the two first embryonic divisions. The following additional strains were used: *C. elegans* VC1670 *gpr-1(ok2126)*, *C. elegans* RB1150 *gpr-2(ok1179)* (two loss-of-function alleles, referred to as *Ce-gpr-1lf*; Caenorhabditis Genetics Center), and *C. briggsae* RW20000 *Cbr-unc-119(st20000)* (Zhao et al., 2010). We analyzed other wild isolates of both species that were both geographically and genetically distinct from the reference strains: *C. elegans* CB4856 and LKC34, and *C. briggsae* ED3092 and HK104. *C. briggsae* and *C. elegans* strains were handled similarly on nematode growth medium (NGM) plates, cultured at 20°C and fed on OP50 bacteria. Fluorescent lines and *Cbr-unc-119* worms were maintained at 25°C. Embryos were recorded at 23°C unless stated otherwise.

Transgenic *C. briggsae* strains

We amplified the full-length *Cbr-gpr-2*, *Cbr-par-2*, and *Cbr-par-6* from AF16 genomic DNA. The genes were then cloned at the C terminus of GFP in the TH303 plasmid (a gift from T. Hyman, Max Planck Institute, Dresden, Germany), under the control of the *C. elegans pie-1* promoter and 3' UTR. The vector also contains the *C. elegans unc-119* gene and promoter. These plasmids were used at 4 µg/µl for coating on gold beads, and beads were then placed on macrocarriers in a hepta-adapter of a Biolistic PDS-1000 HE system (Bio-Rad Laboratories). *Cbr-unc-119* worms (Zhao et al., 2010) were plated and bombarded two times at 1,500 psi. We obtained five independent integrated lines for *Cbr-GPR-2*, one for *Cbr-PAR-6*, and one for *Cbr-PAR-2*. All lines were then backcrossed to the JU1018 strain to obtain worms sensitive to RNAi by ingestion. All lines displayed wild-type phenotypes except one *Cbr-GFP::GPR-2* line that exhibited the strongest cortical GFP signal. Embryos from this line ANA017 displayed rocking of the NCC during overcentration and stronger spindle oscillations.

Gene inactivation by RNAi

RNAi experiments were performed by ingestion of transformed HT115 bacteria in both species. *Cbr-gpb-1* (Gβ), *Cbr-gpr-2*, *Cbr-lin-5*, *Cbr-go-1*, *Cbr-gpa-16*, *Cbr-par-2*, and *Cbr-let-99* genes were amplified from AF16 genomic DNA and cloned into the L4440 plasmid. 48–64 h of feeding at 20°C was needed to obtain the strongest phenotypes in *C. briggsae* JU1018 embryos. *Cbr-Gα(RNAi)* corresponds to a double inactivation of *Cbr-gpa-16* and *Cbr-go-1* genes. After inactivation of *let-99* or *Gβ* by RNAi in *C. elegans*, the uninterrupted rocking of NCC and spindle prevented us from determining the onset of mitotic oscillations. However, NCC and mitotic spindle oscillations were clearly distinguishable after RNAi treatment of these genes in *C. briggsae* embryos, allowing us to measure anaphase oscillation onset. *cid-1* and *C27D9.1* genes were reported to affect embryo size in *C. elegans* embryos (from <http://www.worm.mpi-cbg.de/phenobank/cgi-bin/MenuPage.py>). After inactivation of *cid-1*, we obtained minute embryos, whereas inactivation of *C27D9.1* gave very long embryos. In both cases, embryos were viable and showed no other visible phenotypes.

Recording, tracking, and statistics

Embryos were mounted in M9 onto a 2% agarose pad between a slide and a coverslip and observed on a microscope (Axio Imager A2; Carl Zeiss) equipped with a 100× Plan-Apochromat NA 1.4 lens. We took two images per second from pronuclear appearance to the second cell division using a digital camera (DX4-285FW; Kappa) and the corresponding time-lapse module. We defined $t = 0$ s as the separation of chromosomes at anaphase onset, which is detectable on DIC recordings. All embryos were recorded at 23°C. We found that cell cycle duration was similar between species at this temperature (Table S1). To track nuclei and centrosome position over time, we used the “Manual Tracking” plugin from ImageJ (National Institutes of Health). During mitosis, cortical contractions are reduced and embryo length is constant. This allowed us to set the anterior side of the cell as the spatial reference point. Positions were expressed in percentage of embryo length, with 0% representing the anterior pole and 100% representing the posterior pole. Graphs of centrosome position on the A/P axis and transverse axis as a function of time were analyzed with MATLAB software (MathWorks). In a first stage, low-frequency trends of the transverse centrosome displacements were corrected by a third-order fitting with a polynomial. In a second stage, a low-pass filter was applied to correct the signal

for high-frequency noise. The intersections of the oscillation signal (beyond a predefined time) with the horizontal axis (corresponding to zero transverse displacement) were first detected by a dichotomic algorithm, and then the local extrema for each oscillation were detected in between the successive pairs of intersection points. From these extrema positions, we computed amplitudes and the period of each half-oscillation. The onset and end of oscillations were detected manually from those graphs.

For all measurements, statistical significance was measured using a two-tailed Student's *t* test.

Astral microtubule severing experiments

Embryos were visualized by DIC using a laser microdissection microscope (LMD; Leica) equipped with a pulsed N2 laser ($\lambda = 337$ nm). After completion of nuclei/centrosome rotation, a curve was drawn around the centrosome to cut astral microtubules (as depicted in Fig. 4 A). Because astral microtubules grow extremely quickly (Srayko et al., 2005), we expected that the microtubule network and spindle behavior would be restored a few seconds after the cut. For these experiments, the onset of cytokinesis, assessed by the onset of furrowing, was taken as the reference time point because we could not detect anaphase onset on the laser-equipped microscope. To make sure that heat from the laser did not perturb the embryos, we measured the time from NEBD to the onset of cytokinesis. In wild-type embryos, this interval was 203.4 ± 31.7 s, which was not statistically different from the cut embryos (217.9 ± 34.8 s, $P = 0.37$).

Antibody production and stainings

Cbr-GPR-2 shares only 76% similarity with the nearly identical Cel-GPR-1/2 proteins. This prevented us from detecting Cbr-GPR-2 using antibodies directed against *C. elegans* GPR-1/2 (gifts from P. Gönczy, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland; and L. Rose, University of California, Davis, CA; Colombo et al., 2003; Park and Rose, 2008). We raised a polyclonal antibody against two conserved peptides of GPR-1/2 and Cbr-GPR-2. Eurogentec performed peptide production and rabbit immunization. One rabbit serum yielded a strong GPR signal on fixed *C. briggsae* embryos (1:50) but not on *C. elegans* fixed embryos, nor on a Western blot. Gravid hermaphrodites were placed on polylysine-coated slides and cut open. A coverslip was then placed on the released embryos and excess liquid was removed to flatten the eggs. Slides were placed on frozen aluminum blocks. Once frozen, the coverslip was cracked and slides were plunged in -20°C methanol for at least 5 min. Slides were then rinsed in PBS and stained at room temperature for 45 min for each primary and secondary antibody. The following primary antibodies were used: rabbit anti-Cel-GPR-1 (1:50; Park and Rose, 2008), rabbit anti-GFP (1:500; A6455; Invitrogen), and mouse anti-tubulin (1:100; DM1a; Sigma-Aldrich). Secondary antibodies were a donkey Dylight488 anti-mouse (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), and a donkey Cy3 anti-rabbit (1:2,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). DNA was revealed with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). Stained embryos were imaged using a spectral confocal microscope (SP5; Leica) or a spectral confocal microscope (LSM710; Zeiss), and images were processed with ImageJ. Single confocal planes are shown on the figures.

Quantification of GPR levels

For staining on *C. briggsae* embryos, we used either the anti-Cbr-GPR-2 antibody on wild-type embryos, or anti-GFP antibodies on transgenic lines expressing GFP::Cbr-GPR-2. Except in Fig. 4 D, we used a Cbr-GFP::GPR-2 line displaying wild-type phenotypes to assess GPR levels. *C. briggsae* embryos stained with the antibody against Cbr-GPR-2 are shown on Fig. S2 A. GFP signals from the Cbr-GFP-GPR-2 transgenic line are shown on Fig. 4 (B, C, E, and F), Fig. 5 B, and Fig. S2 (B–D). GPR quantification was performed from mid-plane single confocal images. Only late metaphase and anaphase one-cell embryos were processed for Fig. 4, as the GPR domain is expanding in telophase embryos. First, a 5-pixel line was drawn on the embryo cortex using ImageJ, and pixel intensity was measured using the "Plot profile" function. Using MATLAB, we detected the embryo contour from these images and computed its barycentric coordinates, and the symmetric long axis and the transverse axis of the embryo were plotted. This reference frame was used to convert the two-dimensional coordinates of the GPR contour data into cell-length percentages. For each embryo, the half top or bottom cortices were treated separately, as they often displayed different profiles. The number of embryos processed is shown on Fig. 4, corresponding to several cortices varying between *n* and *2n*. To measure the A/P ratio of GPR levels in prophase embryos, we quantified pixel intensity in a large cytoplasmic region in both species, as depicted in Fig. 5 B.

Western blots

Cbr-GFP::GPR-2 lines were synchronized and L3 larvae were then fed for 48 h on NGM plates seeded with bacteria expressing *Cbr-Gβ* double-stranded RNA (dsRNA), a control RNAi (*C. elegans unc-22*), or control NGM plates. From these worms, embryonic extracts were prepared and loaded onto SDS-PAGE gels. A mouse anti-tubulin antibody (DM1a; Sigma-Aldrich) was used at 1:2,000 as a loading control. A mouse monoclonal anti-GFP antibody (Roche) was used at 1:1,000 as a readout of GPR over-all levels. Primary antibodies were stained overnight at 4°C . Anti-mouse secondary antibodies were used at 1:5,000 (NA931; GE) for 40 min at room temperature.

Online supplemental material

Fig. S1 shows that $G\alpha$ -GPR-LIN-5-dependent unbalanced pulling forces control the first cell division of *C. briggsae* embryos. Fig. S2 shows Cbr-GPR-2 localization and levels in *C. briggsae* wild-type and RNAi-treated embryos. Video 1 shows a time-lapse DIC recording of a wild-type *C. elegans* N2 embryo. Video 2 shows a time-lapse DIC recording of a wild-type *C. briggsae* JU1018 embryo. Video 3 shows a time-lapse DIC recording of a wild-type *C. briggsae* JU1018 embryo after laser severing of anterior astral microtubules using a pulsed N2 laser from a Leica LMD microscope ($\lambda = 337$ nm). Video 4 shows a time-lapse DIC recording of a *C. briggsae* embryo treated with *Cbr-gpr-2(RNAi)*. Video 5 shows a time-lapse DIC recording of a *C. briggsae* embryo from the ANA017 line, in which Cbr-GPR-2 is found in excess. Video 6 shows a time-lapse DIC recording of a *C. briggsae* embryo treated with *Cbr-Gβ(RNAi)*. Video 7 shows a time-lapse DIC recording of a *C. briggsae* embryo treated with *Cbr-let-99(RNAi)*. Table S1 shows quantification of events in *C. elegans* and *C. briggsae* strains. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201210110/DC1>.

This work has been initiated in the laboratory of M.-A. Félix. We are very grateful to her for help and fruitful discussions. We thank P. Gönczy, M.-A. Félix, and anonymous reviewers for critical reading of the manuscript. We thank A. Khalil and D. Cluet for help with image processing, N. Bozonnet for technical help, and the Plateau Technique Imagerie/Microscopie (PLATIM) imaging facility of the Unité Mixte de Service Biosciences (Lyon, France). We thank the Gönczy laboratory for sharing its laser-equipped microscope. Some nematode strains used in this work were provided by the Caenorhabditis Genetics Center, which is funded by the National Institutes of Health National Center for Research Resources (NCRR).

This project has been funded by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (ATIP) and the ARC foundation to M. Delattre. S. Riche is supported by a PhD fellowship from the Region Rhône-Alpes.

Submitted: 22 October 2012

Accepted: 11 April 2013

References

- Brauchle, M., K. Kiontke, P. MacMenamin, D.H. Fitch, and F. Piano. 2009. Evolution of early embryogenesis in rhabditid nematodes. *Dev. Biol.* 335: 253–262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.07.033>
- Colombo, K., S.W. Grill, R.J. Kimple, F.S. Willard, D.P. Siderovski, and P. Gönczy. 2003. Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Science*. 300:1957–1961. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1084146>
- Dolgin, E.S., M.A. Félix, and A.D. Cutter. 2008. Hakuna Nematoda: genetic and phenotypic diversity in African isolates of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae*. *Heredity (Edinb)*. 100:304–315. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6801079>
- Galli, M., J. Muñoz, V. Portegijs, M. Boxem, S.W. Grill, A.J. Heck, and S. van den Heuvel. 2011. aPKC phosphorylates NuMA-related LIN-5 to position the mitotic spindle during asymmetric division. *Nat. Cell Biol.* 13: 1132–1138. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2315>
- Gönczy, P. 2008. Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:355–366. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2388>
- Gotta, M., Y. Dong, Y.K. Peterson, S.M. Lanier, and J. Ahringer. 2003. Asymmetrically distributed *C. elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Curr. Biol.* 13:1029–1037. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00371-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00371-3)
- Goulding, M.B., J.C. Canman, E.N. Senning, A.H. Marcus, and B. Bowerman. 2007. Control of nuclear centration in the *C. elegans* zygote by receptor-independent $G\alpha$ signaling and myosin II. *J. Cell Biol.* 178:1177–1191. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200703159>

- Grill, S.W., P. Gönczy, E.H. Stelzer, and A.A. Hyman. 2001. Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature*. 409:630–633. <http://dx.doi.org/10.1038/35054572>
- Gusnowski, E.M., and M. Srayko. 2011. Visualization of dynein-dependent microtubule gliding at the cell cortex: implications for spindle positioning. *J. Cell Biol.* 194:377–386. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201103128>
- Kimura, K., and A. Kimura. 2011. A novel mechanism of microtubule length-dependent force to pull centrosomes toward the cell center. *Bioarchitecture*. 1:74–79. <http://dx.doi.org/10.4161/bioa.1.2.15549>
- Kimura, A., and S. Onami. 2005. Computer simulations and image processing reveal length-dependent pulling force as the primary mechanism for *C. elegans* male pronuclear migration. *Dev. Cell*. 8:765–775. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2005.03.007>
- Labbé, J.C., E.K. McCarthy, and B. Goldstein. 2004. The forces that position a mitotic spindle asymmetrically are tethered until after the time of spindle assembly. *J. Cell Biol.* 167:245–256. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200406008>
- McCarthy Campbell, E.K., A.D. Werts, and B. Goldstein. 2009. A cell cycle timer for asymmetric spindle positioning. *PLoS Biol.* 7:e1000088. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000088>
- Nuez, I., and M.A. Félix. 2012. Evolution of susceptibility to ingested double-stranded RNAs in *Caenorhabditis* nematodes. *PLoS ONE*. 7:e29811. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029811>
- Panbianco, C., D. Weinkove, E. Zanin, D. Jones, N. Divecha, M. Gotta, and J. Ahringer. 2008. A casein kinase 1 and PAR proteins regulate asymmetry of a PIP(2) synthesis enzyme for asymmetric spindle positioning. *Dev. Cell*. 15:198–208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2008.06.002>
- Park, D.H., and L.S. Rose. 2008. Dynamic localization of LIN-5 and GPR-1/2 to cortical force generation domains during spindle positioning. *Dev. Biol.* 315:42–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.037>
- Pecreaux, J., J.C. Röper, K. Kruse, F. Jülicher, A.A. Hyman, S.W. Grill, and J. Howard. 2006. Spindle oscillations during asymmetric cell division require a threshold number of active cortical force generators. *Curr. Biol.* 16:2111–2122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.030>
- Redemann, S., S. Schloissnig, S. Ernst, A. Pozniakowsky, S. Ayloo, A.A. Hyman, and H. Bringmann. 2011. Codon adaptation-based control of protein expression in *C. elegans*. *Nat. Methods*. 8:250–252. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1565>
- Srayko, M., A. Kaya, J. Stamford, and A.A. Hyman. 2005. Identification and characterization of factors required for microtubule growth and nucleation in the early *C. elegans* embryo. *Dev. Cell*. 9:223–236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2005.07.003>
- Thyagarajan, K., K. Afshar, and P. Gönczy. 2011. Polarity mediates asymmetric trafficking of the Gbeta heterotrimeric G-protein subunit GPB-1 in *C. elegans* embryos. *Development*. 138:2773–2782. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.063354>
- Tsou, M.F., A. Hayashi, and L.S. Rose. 2003. LET-99 opposes Galpha/GPR signaling to generate asymmetry for spindle positioning in response to PAR and MES-1/SRC-1 signaling. *Development*. 130:5717–5730. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.00790>
- Werts, A.D., M. Roh-Johnson, and B. Goldstein. 2011. Dynamic localization of *C. elegans* TPR-GoLoco proteins mediates mitotic spindle orientation by extrinsic signaling. *Development*. 138:4411–4422. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.070979>
- Zhao, Z., S. Flibotte, J.I. Murray, D. Blick, T.J. Boyle, B. Gupta, D.G. Moerman, and R.H. Waterston. 2010. New tools for investigating the comparative biology of *Caenorhabditis briggsae* and *C. elegans*. *Genetics*. 184:853–863. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.109.110270>

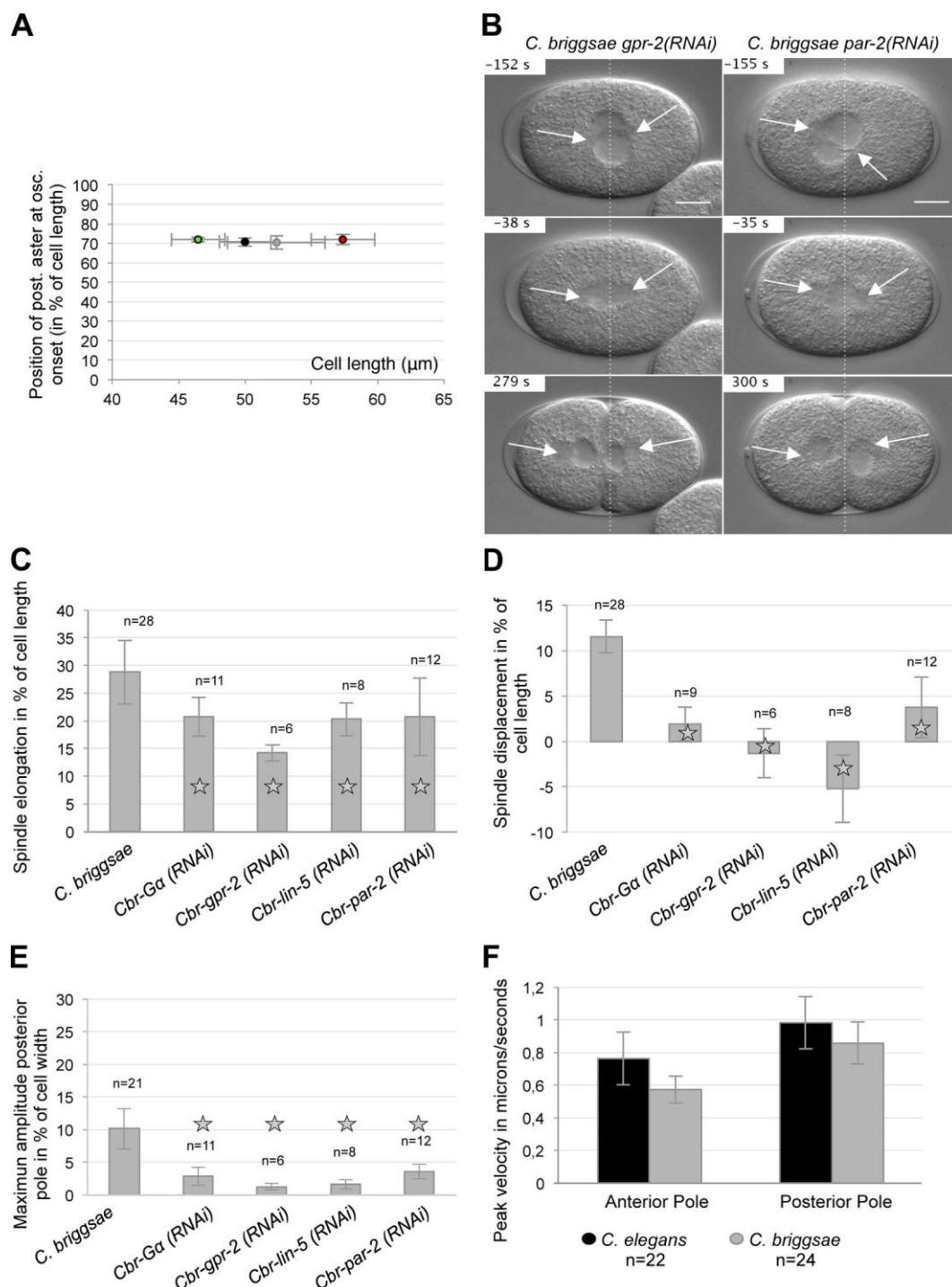
Riche et al., <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201210110/DC1>

Figure S1. **G α -GPR-LIN-5-dependent unbalanced pulling forces control the first cell division of *C. briggsae* embryos.** (A) Position of the posterior centrosome (at oscillation onset) is shown relative to absolute embryo length in microns for wild-type *C. elegans* ($n = 33$) in black, wild-type *C. briggsae* ($n = 28$) in gray, short *C. elegans* embryos in green (after inactivation of the *cid-1* gene; $n = 10$), and long *C. elegans* embryos in red (after inactivation of the *C27D9.1* gene; $n = 7$). Regardless of embryo size, the centrosome starts to oscillate around 70% of embryo length. Error bars indicate standard deviation. (B) Snapshots from DIC recordings of *Cbr-gpr-2(RNAi)* and *Cbr-par-2(RNAi)* embryos. Time is shown relative to anaphase onset ($t = 0$ s). Anterior is to the left. Broken lines are positioned at 50% of embryo length. Arrows show the asters. Bars, 10 μm . (C–E) Measurements of spindle motion for n embryos of wild-type *C. briggsae*, *Cbr-Ga(RNAi)*, *Cbr-gpr-2(RNAi)*, *Cbr-lin-5(RNAi)*, and *Cbr-par-2(RNAi)*. Error bars indicate standard deviation. Statistical differences are shown with a star for comparison to wild-type *C. briggsae* ($P < 0.05$). (C) Initial spindle length (at metaphase onset) is subtracted from final spindle length (at cytokinesis onset), and is represented in percentage of cell length. (D) Initial position of the center of the spindle (at metaphase onset) is subtracted from position of the center of the spindle at cytokinesis onset. The distance is shown in percentage of cell length. Negative values correspond to an anterior shift of the spindle during anaphase. (E) Maximum amplitude of transverse oscillation of the posterior centrosome is measured in percentage of cell width. (F) The mitotic central spindle was severed using a laser microbeam at anaphase onset in both species. The mean peak velocity of released asters was measured in microns per second. Error bars indicate standard deviation.

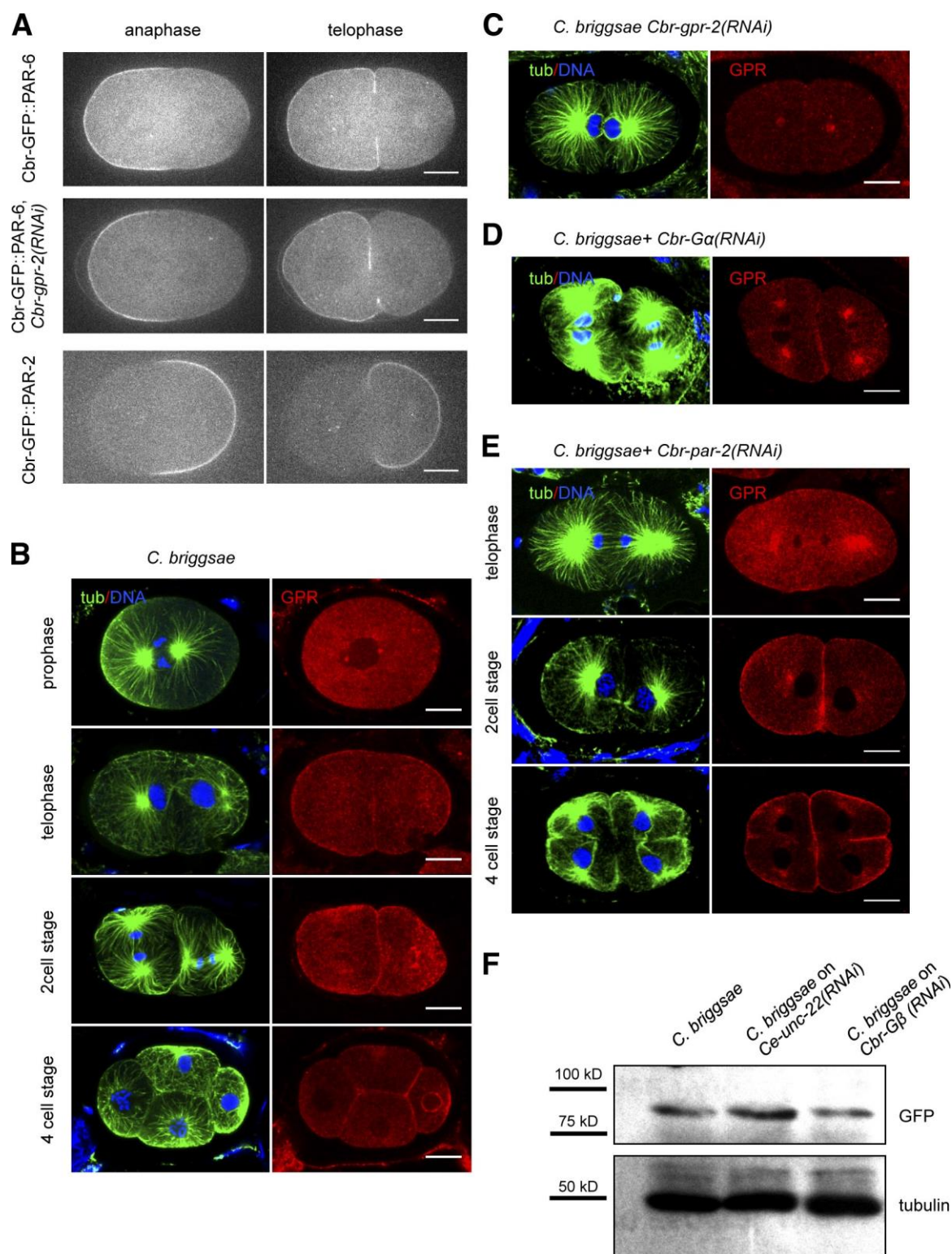
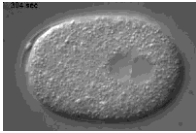


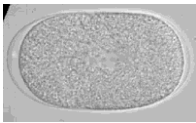
Figure S2. **Cbr-GPR-2 localization and levels in *C. briggsae* wild-type and RNAi-treated embryos.** (A) Snapshots of spinning disk movies from one representative embryo among 10 transgenic *C. briggsae* embryos expressing Cbr-PAR-6 or Cbr-PAR-2 fused to GFP. Anterior is to the left. As in *C. elegans*, PAR-6 and PAR-2 localize to opposite cortical domains. In the absence of *Cbr-gpr-2*, polarity is intact, confirming that, as in *C. elegans*, GPR-2 acts downstream of polarity proteins. (B–E) On all panels, microtubules are shown in green, DNA in blue, and GPR in red. The anterior pole is to the left. (B) *C. briggsae* wild-type embryos stained with an antibody against Cbr-GPR-2 at different stages. (C) *Cbr-gpr-2(RNAi)* telophase embryo stained with an antibody against Cbr-GPR-2 showing the specificity of the antibody for cortical and cytoplasmic signals. (D–F) Embryos expressing Cbr-GPR-2 fused to GFP were used, from transgenic lines showing no signs of GPR overexpression. (D) Embryos were subjected to *Cbr-Gα(RNAi)* and stained using an antibody against GFP. The cortical signal of GPR is strongly decreased. (E) Embryos were subjected to *Cbr-par-2(RNAi)* and stained using an antibody against GFP. GPR is found uniformly around the cortex and in the cytoplasm. (F) Embryos were treated with RNAi against *Cbr-Gβ* or the *C. elegans unc-22* gene as a negative control. Embryos were then prepared for protein extraction. The Western blot reveals GFP levels as a readout of GPR quantity in treated and untreated embryos. Tubulin was used as a loading control. Bars, 10 μ m.



Video 1. **Time-lapse DIC recording of a wild-type *C. elegans* N2 embryo.** Images were acquired using a microscope (Axio Imager A2; Carl Zeiss) at 100 \times . Frames were captured every 0.5 s.



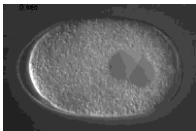
Video 2. **Time-lapse DIC recording of a wild-type *C. briggsae* JU1018 embryo.** Images were acquired using a microscope (Axio Imager A2; Carl Zeiss). Frames were captured every 0.5 s.



Video 3. **Time-lapse DIC recording of a wild-type *C. briggsae* JU1018 embryo after laser severing of anterior astral microtubules using a pulsed N2 laser from a Leica LMD microscope ($\lambda = 337$ nm).** Frames were captured every 0.5 s.



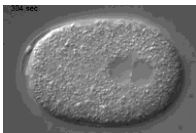
Video 4. **Time-lapse DIC recording of a *C. briggsae* embryo treated with *Cbr-gpr-2(RNAi)*.** Images were acquired using a microscope (Axio Imager A2; Carl Zeiss). Frames were captured every 0.5 s.



Video 5. **Time-lapse DIC recording of a *C. briggsae* embryo from the ANA017 line, in which Cbr-GPR-2 is found in excess.** Images were acquired using a microscope (Axio Imager A2; Carl Zeiss). Frames were captured every 0.5 s.



Video 6. **Time-lapse DIC recording of a *C. briggsae* embryo treated with *Cbr-Gβ(RNAi)*.** Images were acquired using a microscope (Axio Imager A2; Carl Zeiss). Frames were captured every 0.5 s.



Video 7. **Time-lapse DIC recording of a *C. briggsae* embryo treated with *Cbr-let-99(RNAi)*.** Images were acquired using a microscope (Axio Imager A2; Carl Zeiss). Frames were captured every 0.5 s.

Table S1. Quantification of events associated with the first embryonic division in *C. elegans* and *C. briggsae* strains

Traits	<i>C. elegans</i> N2	<i>C. elegans</i> CB4856	<i>C. elegans</i> LKC34	<i>C. briggsae</i> JU1018	<i>C. briggsae</i> HK104	<i>C. briggsae</i> ED3092	<i>C. briggsae</i> JU1018 at 28°C
Embryo length (μm)	50.00 ± 1.95 (n = 33)	50.73 ± 2.01 (n = 23) ^a	50.92 ± 2.59 (n = 17)	52.37 ± 3.67 (n = 28)	52.56 ± 2.05 (n = 25) ^b	51.00 ± 2.31 (n = 18)	ND
Embryo width (μm)	33.70 ± 1.46 (n = 33)	34.59 ± 1.47 (n = 23)	34.15 ± 1.50 (n = 17)	34.21 ± 1.92 (n = 28)	31.62 ± 1.70 (n = 25) ^b	31.14 ± 1.46 (n = 18) ^b	ND
Spindle length at metaphase onset (%)	26.48 ± 2.80 (n = 19) ^a	ND	ND	24.48 ± 1.56 (n = 16) ^b	ND	ND	ND
Spindle center at metaphase onset (%)	51.45 ± 1.66 (n = 19) ^a	50.54 ± 3.56 (n = 10)	49.91 ± 0.87 (n = 6)	46.59 ± 1.56 (n = 16) ^b	43.98 ± 2.31 (n = 7)	46.00 ± 2.69 (n = 6)	ND
Spindle length at anaphase onset (%)	29.72 ± 2.33 (n = 19)	ND	ND	28.30 ± 2.06 (n = 16)	ND	ND	ND
Spindle center at anaphase onset (%)	56.02 ± 1.83 (n = 19) ^a	55.57 ± 3.72 (n = 12)	53.30 ± 1.07 (n = 5)	48.72 ± 1.59 (n = 16) ^b	47.92 ± 1.20 (n = 8)	50.95 ± 2.37 (n = 6)	ND
Posterior aster position at anaphase onset (%)	70.85 ± 1.64 (n = 33) ^a	70.09 ± 2.91 (n = 23) ^a	69.84 ± 1.91 (n = 15) ^a	62.89 ± 2.21 (n = 28) ^b	62.65 ± 1.33 (n = 17) ^b	66.90 ± 2.49 (n = 18) ^b	ND
Posterior aster position at oscillation onset (%)	70.69 ± 2.14 (n = 33)	69.51 ± 3.30 (n = 23)	70.86 ± 2.46 (n = 16)	69.88 ± 3.00 (n = 26)	69.35 ± 2.60 (n = 17)	71.55 ± 3.32 (n = 18)	71.58 ± 2.92 (n = 8)
Time at oscillation onset (s)	-0.65 ± 8.58 (n = 33) ^a	-4.59 ± 13.87 (n = 23) ^a	0.44 ± 15.55 (n = 16) ^a	31.34 ± 12.47 (n = 26) ^b	25.15 ± 11.55 (n = 17) ^b	14.17 ± 14.62 (n = 18) ^b	16.62 ± 15.09 (n = 8) ^b
Posterior aster at cytokinesis onset (%)	80.15 ± 1.34 (n = 15)	80.41 ± 2.30 (n = 12)	79.72 ± 1.06 (n = 10) ^a	79.18 ± 1.83 (n = 13)	78.72 ± 0.97 (n = 10) ^b	81.20 ± 1.56 (n = 11)	ND
Anterior aster at cytokinesis onset (%)	34.06 ± 1.46 (n = 33)	31.83 ± 2.11 (n = 12)	32.19 ± 1.32 (n = 10)	31.03 ± 1.19 (n = 28)	31.11 ± 1.49 (n = 10) ^b	29.20 ± 1.62 (n = 11) ^b	ND
Mean amplitude of posterior aster oscillation (%)	15.06 ± 3.61 (n = 17) ^a	14.56 ± 2.56 (n = 17) ^a	16.13 ± 2.69 (n = 9) ^a	7.53 ± 2.37 (n = 21) ^b	6.65 ± 2.00 (n = 8) ^b	9.45 ± 2.65 (n = 11) ^b	10.1 ± 4.83 (n = 6) ^b
Maximum amplitude of posterior oscillation (%)	18.99 ± 3.87 (n = 17) ^a	18.60 ± 2.96 (n = 17) ^a	21.22 ± 2.98 (n = 9) ^a	10.14 ± 3.10 (n = 21) ^b	9.20 ± 2.69 (n = 8) ^b	13.14 ± 3.84 (n = 11) ^b	12.7 ± 4.95 (n = 6) ^b
Mean frequency of posterior oscillation (mHz)	47.7 ± 12.4 (n = 17)	49.6 ± 9.2 (n = 17)	39.8 ± 4.0 (n = 9) ^a	46.3 ± 5.6 (n = 21)	45.9 ± 11.2 (n = 8)	52.3 ± 9.5 (n = 11)	62.4 ± 6.6 (n = 6) ^b
Maximum amplitude of anterior oscillation (%)	11.21 ± 3.2 (n = 33) ^a	ND	ND	5.36 ± 1.4 (n = 25) ^b	ND	ND	ND
NEBD to cytokinesis (s)	282.6 ± 29.57 (n = 11)	ND	ND	277.2 ± 45.48 (n = 9)	ND	ND	ND

Three *C. elegans* and three *C. briggsae* wild-type strains recorded at 23°C are shown, as well as *C. briggsae* JU1018 animals raised and recorded at 28°C. Values represent means ± SD. NEBD, nuclear envelope break down. *n* = the number of embryos per condition. Two-tailed Student's *t* test was used.

^aStatistical differences (*P* < 0.05) for comparison with *C. briggsae* JU1018.

^bStatistical differences (*P* < 0.05) for comparison with the *C. elegans* N2 strain.

III. Discussion/ Conclusion

L'étude comparative du positionnement du fuseau mitotique dans les espèces *C. elegans* et *C. briggsae* a mis en avant que les phénotypes différents observés lors de la première division de l'embryon dans ces espèces étaient en partie dus à un mécanisme conservé que nous avons nommé « Switch positionnel ». Chez *C. elegans* des différences d'amplitude des oscillations du fuseau ont classiquement été associées à des différences dans l'intensité des forces de traction exercées sur chacun des pôles du fuseau. La découverte du Switch positionnel montre que les générateurs de force ne sont pas les seuls responsables de l'amplitude des oscillations. En effet l'amplitude est contrôlée également par la durée des oscillations. Dans l'embryon de *C. elegans* la phase oscillatoire est plus longue que pour *C. briggsae* à cause du Switch positionnel. Un autre projet de l'équipe a consisté à enregistrer et mesurer les mouvements du fuseau mitotique dans 40 autres espèces de nématodes. Dans toutes les espèces du genre *Caenorhabditis* les oscillations du fuseau sont retrouvées, bien que présentant des amplitudes très différentes. Dans toutes ces espèces, les oscillations démarrent lorsque le centrosome postérieur atteint 70% de la longueur de l'embryon. De plus, l'amplitude des oscillations corrèle systématiquement avec la durée des oscillations. Ainsi, il semble que le switch positionnel mis en évidence en comparant deux espèces, soit conservé chez tous les *Caenorhabditis* (Valfort *et al.*, en préparation).

Bien que les oscillations n'aient pas de rôle dans la division, elles reflètent l'action des forces mécaniques. Nous avons donc voulu comprendre la signification de ce Switch positionnel, en collaboration avec Jacques Pécréaux. Nous avons cherché à expliquer mécaniquement le fonctionnement de ce Switch positionnel en accord avec son modèle de l'augmentation de la processivité des moteurs proposé en 2006 (Pecreaux *et al.*, 2006). Dans *C. briggsae*, le délai pour le démarrage des oscillations ne peut pas s'expliquer par un simple retard de la processivité des moteurs car cela n'explique pas le fait que la durée des oscillations soit plus courte et les oscillations de plus faible amplitude. Un nouveau modèle physique est alors proposé prenant en compte le mécanisme de Switch positionnel. Dans le précédent modèle, la dynamique des microtubules était considérée comme négligeable, puisque la quantité de microtubules atteignant le cortex était largement supérieure à celle des générateurs de force disponible. Elle ne constituait donc pas un facteur limitant. En revanche dans le nouveau modèle, à cause de l'effet de position, la dynamique des

microtubules devient importante. Du fait de la restriction postérieure du domaine (contenant GPR) où les générateurs de force sont localisés, si l'aster est trop loin de cette zone, seuls les microtubules qui parviennent jusqu'au cortex vont contribuer aux mouvements du fuseau. Ainsi, même si l'augmentation graduelle de la processivité se fait dès la métaphase et que le seuil de moteurs activés pour le démarrage des oscillations est atteint rapidement, le fuseau n'oscillera que lorsqu'il atteindra la zone critique. Le modèle prédit par exemple que la localisation du Switch positionnel est robuste à des changements de taille de l'embryon, ce que nous avons pu tester expérimentalement (Riche et al., 2013). Ce modèle est en accord avec le modèle proposé par Lesilee Rose pour la répartition des forces de traction (Krueger et al., 2010). La zone du cortex où se situe la protéine LET-99 et qui se trouve en amont de la zone de Switch positionnel, les forces latérales sont plus faibles et le fuseau n'oscille pas (Voir Introduction - Figure 26). En revanche, une fois que le centrosome dépasse cette zone et arrive au niveau du Switch positionnel dicté par le domaine cortical de GPR, le fuseau va commencer à osciller. Dans ce modèle, les oscillations sont donc initiées lorsque l'aster postérieur est assez proche du cortex et que des microtubules peuvent être capturés par les complexes générateurs de force. Cette position est contrôlée par le domaine cortical postérieur de GPR dont la limite s'établit à 70% de la longueur de l'embryon. La durée des oscillations ainsi que l'augmentation graduelle de la processivité contrôlent l'amplitude des oscillations. Lorsque la processivité atteint un plateau suite à l'activation de tous les moteurs cela mène à un état d'équilibre conduisant à l'arrêt progressif des oscillations du fuseau. Ce modèle « revisité » n'a pas été publié.

Ce travail a révélé que s'il existait un mécanisme conservé de Switch positionnel pour les mouvements du fuseau en anaphase, le positionnement des noyaux en fin de rotation n'était pas régulé de la même manière dans les deux espèces. Bien qu'ayant montré l'implication du complexe Gα/GPR/LIN5 dans l'overcentration chez *C. briggsae*, nous n'avons pas exploré plus en avant ce mécanisme d'overcentration. Dans le modèle proposé par Gusnowski et Srayko pour la centration chez *C. elegans*, l'action du complexe ternaire n'est pas prédominante du fait de l'angle formé par les microtubules avec le cortex (Gusnowski and Srayko, 2011). La centration se ferait donc principalement par le phénomène de glissement des microtubules le long du cortex, par l'action couplée de la dynéine et de LIN-5. Si ce phénomène était aussi responsable de l'overcentration chez *C. briggsae*, nous aurions dû abolir l'overcentration uniquement après inactivation de LIN-5, mais pas de GPR ou Gα.

Or, chacune des protéines est nécessaire à l'overcentration, suggérant que le complexe ternaire est principalement impliqué dans ce processus. Comme chez *C. elegans*, en l'absence des protéines Gα, GPR et LIN-5, le NCC est tout de même centré. Il faudrait analyser les mouvements précis des noyaux et leur vitesse pendant la centration, mais ce résultat suggère que le centrage n'est pas dépendant des forces de traction corticales (via le complexe ternaire ou le glissement induit par LIN-5/dynéine) et serait donc le résultat de la force de centrage des microtubules qui poussent contre le cortex. Comme pour les amplitudes différentes ou encore le délai dans le démarrage des oscillations, étudier l'overcentration du NCC de *C. briggsae* pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme de centrage.

Pour conclure, la comparaison précise de ces deux espèces proches a permis de révéler des variations cryptiques lors de la première division embryonnaire. Ainsi, bien que le produit final, la division asymétrique, soit un programme développemental très conservé dans l'évolution des nématodes, de manière inattendue, des variations peuvent exister pour contrôler le positionnement du fuseau mitotique.

Enfin, ce travail a permis de montrer que les outils utilisés sur *C. elegans* sont également accessibles chez *C. briggsae* comme l'inactivation de gènes ou la création de lignées transgéniques. Notamment, il est possible d'exprimer des transgènes dans la lignée germinale et donc l'embryon. Il nous est apparu que *C. briggsae* et notamment l'embryon précoce, pouvait désormais être utilisé comme objet d'étude, faisant de *C. briggsae* une espèce satellite de *C. elegans* pour d'autres approches comparatives.

Chapitre 2: Évolution fonctionnelle de GPR ; identification des domaines régulateurs clés.

I. Introduction

Nos travaux ont montrés que des différences de régulation de GPR entre *C. elegans* et *C. briggsae* expliquaient en partie les différences phénotypiques observées. Les protéines GPR des deux espèces présentent seulement 59% de similarité en acides aminés. Ainsi, des divergences de séquence entre les orthologues pourraient expliquer les différences de régulation. Notre système nous permet de corréler les divergences en séquences avec des différences de localisation subcellulaire de GPR et des différences d'activité de GPR (par l'analyse quantitative des mouvements des noyaux et du fuseau mitotique). Nous nous sommes alors demandé quels phénotypes nous observerions si *C. elegans* exprimait la protéine GPR de *C. briggsae* et inversement ? Qu'allons-nous observer au niveau des oscillations du fuseau et au niveau du positionnement des pronoyaux ? Est-ce que l'overcentration du NCC peut être reproduite dans une souche de *C. briggsae* exprimant la protéine Ce-GPR-1 ou Ce-GPR-2 ? De même comment seront les amplitudes des oscillations ? Pour répondre à toutes ces questions nous avons entrepris une expérience de remplacement de gènes, c'est-à-dire remplacer le gène *gpr* de *C. elegans* (*Ce-gpr-1/2*) par celui de *C. briggsae* (*Cbr-gpr-2*) et inversement.

Nous avons également pensé qu'en construisant des protéines chimères entre Ce-GPR-1/2 et Cbr-GPR-2, nous pourrions révéler des régulations différentes, et ainsi identifier les domaines essentiels à la régulation de GPR, dans chacune des espèces. La protéine GPR est caractérisée par seulement deux domaines encore mal définis : le domaine TPR qui interagit avec LIN-5 et le domaine GoLoco qui interagit avec Gα. Il est donc possible que d'autres domaines soient importants pour la régulation de ces protéines. Nous avons donc créé des lignées transgéniques exprimant une partie de la protéine de l'autre espèce couplée à une partie de la protéine endogène. Les protéines résultant de ces construits seront appelées protéines « chimères ». Puis, grâce aux mêmes analyses que pour l'expérience de remplacement de gènes, nous avons observé les phénotypes associés aux domaines protéiques exprimés.

Enfin nous souhaitons tester si les régulateurs de ces protéines étaient conservés ou bien si la divergence évolutive avait modifié les interactions dans chacune des espèces. Par

exemple est-ce que Ce-LIN-5 peut toujours interagir avec Cbr-GPR-2 malgré la faible conservation des protéines ? Hormis les protéines qui composent le complexe générateur de force d'autres protéines peuvent réguler le complexe. Par exemple Ce-LIN-5 est phosphorylée à l'antérieur par Ce-PKC-3 ou encore Ce-LET-99 exclut GPR-1/2 du cortex par un mécanisme inconnu. De par les divergences de séquence en acides aminés il serait informatif de tester si ces régulations sont conservées ou alors si, suite à l'évolution, les protéines ont adopté d'autres modes de régulation et dans ce cas identifier lesquels.

II. Résultats

II.A. Expérience de remplacement de gène

Nous avons d'abord testé si la protéine GPR de *C. briggsae* pouvait remplacer celle de *C. elegans* et réciproquement. Pour cela nous avons transformé des lignées de *C. elegans* et *C. briggsae* en leur insérant respectivement *Cbr-gpr-2* et *Ce-gpr-2*. Chaque transgène a été fusionné à la séquence de la GFP pour pouvoir suivre la localisation dynamique des transgènes au cours de la mitose. Les transgènes ont également été placés sous contrôle du promoteur *Ce-pie-1*. Ce promoteur est un promoteur fort permettant l'expression dans la lignée germinale des transgènes dans les deux espèces (voir Chapitre 1).

Pour simplifier nous appellerons *Ce + Cbgpr* la lignée *C. elegans* exprimant *gfp ::Cbr-gpr-2* (ANA064) et *Cb + Cegpr* la lignée *C. briggsae* exprimant *gfp ::Ce-gpr-2* (ANA097). Dans un premier temps nous avons analysé ces lignées qui expriment à la fois la protéine endogène et la protéine transgénique. Puis, dans un second temps, nous avons testé la fonctionnalité des transgènes en déplétant les embryons des protéines endogènes. Du fait de la divergence de séquence nucléotidique, les gènes endogènes peuvent être inactivés par RNAi car le double brin d'ARN ne peut pas cibler les deux orthologues à la fois. Nous avons donc réalisé un RNAi contre le gène endogène dans chacune des lignées transgéniques. Puisque *C. briggsae* est insensible au RNAi par ingestion, la lignée *Cb + Cegpr* a été croisée préalablement avec la lignée de *C. briggsae* exprimant le transporteur d'ARN (voir Matériel et Méthode §I). Ceci nous a permis de réaliser les expériences d'inactivation de *Cbr-gpr-2* endogène par ingestion de double brin d'ARN.

II.A.1. *Cbr-gpr-2* est fonctionnel dans *C. elegans*

Une lignée de *C. elegans* exprimant *Cbr-gpr-2* fusionné à la GFP a été obtenue par MosSCI. La lignée est viable et ne présente pas de létalité embryonnaire. Le transgène est localisé comme attendu au cortex dans les embryons et la gonade. La première division des embryons des nouvelles lignées générées a été filmée en optique DIC. Puis comme pour l'étude précédente j'ai analysé les mouvements des pronoyaux et du fuseau mitotique au cours de la première division embryonnaire par tracking manuel ou tracking automatique (voir Matériel et Méthodes §V.D.1 et V.D.2).

Les embryons de la lignée *Ce + Cbgpr* présentent une division asymétrique mais les mouvements du fuseau sont nettement augmentés par rapport à la souche sauvage de

C. elegans. De même, les pronoyaux font des mouvements excessifs de rocking lors de la centration/rotation. L'analyse des mouvements des pôles du fuseau montrent que le centrosome postérieur (en rouge sur le graphe) oscille avec une amplitude maximum de $25,3 \pm 5,4\%$ de la hauteur de l'embryon contre $19,0 \pm 3,9\%$ pour *C. elegans* ($p=0,002$). Et le centrosome antérieur oscille avec une amplitude de $22,0 \pm 2,5\%$ contre $11,2 \pm 3,2\%$ pour *C. elegans* ($p=9,9.10^{-10}$) (Figure 32). Étonnamment, l'amplitude d'oscillation du centrosome antérieur de *Ce + Cbgpr* est même plus forte que celle du centrosome postérieur d'un embryon sauvage de *C. elegans* ($p=0,020$). Il semble donc que l'ajout d'une copie de *Cbr-gpr-2* influence le comportement du fuseau mitotique de *C. elegans*, et plus particulièrement les oscillations du centrosome antérieur.

Nous avons ensuite inactivé *Ce-gpr-1/2* endogène dans cette lignée par RNAi. *Ce-gpr-1/2* a parallèlement été inactivé dans des embryons de *C. elegans* sauvages comme contrôle de l'efficacité du RNAi. Dans un embryon contrôle de *C. elegans*, l'inactivation de *gpr* provoque l'arrêt total des oscillations et la division embryonnaire est symétrique (Figure 32). En revanche, dans la lignée *Ce + Cbgpr* on constate que les oscillations restent fortes et la division est toujours asymétrique. Cette expérience nous montre que le transgène seul peut parvenir à l'accomplissement d'une division asymétrique. L'amplitude d'oscillation du centrosome postérieur est également semblable à celle de *C. elegans* ($22,0 \pm 5,1\%$ vs $19,0 \pm 3,9\%$ pour *C. elegans*; $p=0,12$). En revanche celle du centrosome antérieur reste bien supérieure à celle de la souche sauvage de *C. elegans* ($20,5 \pm 5,7\%$ vs $11,2 \pm 3,2\%$ pour *C. elegans*; $p=4,4.10^{-4}$).

Ces résultats suggèrent d'une part que la protéine Cb-GPR-2 peut remplacer celle de *C. elegans* lors de la première division embryonnaire. D'autre part elle semble se comporter comme la protéine endogène dans la régulation des mouvements du pôle postérieur du fuseau et est donc capable de générer de fortes oscillations. En revanche le comportement du pôle antérieur est complètement différent de ce que l'on peut observer dans une souche sauvage de *C. elegans* ou même de *C. briggsae* ce qui indique un changement dans la régulation de la protéine Cbr-GPR-2 à l'antérieur de la cellule dans un fond génétique *C. elegans*.

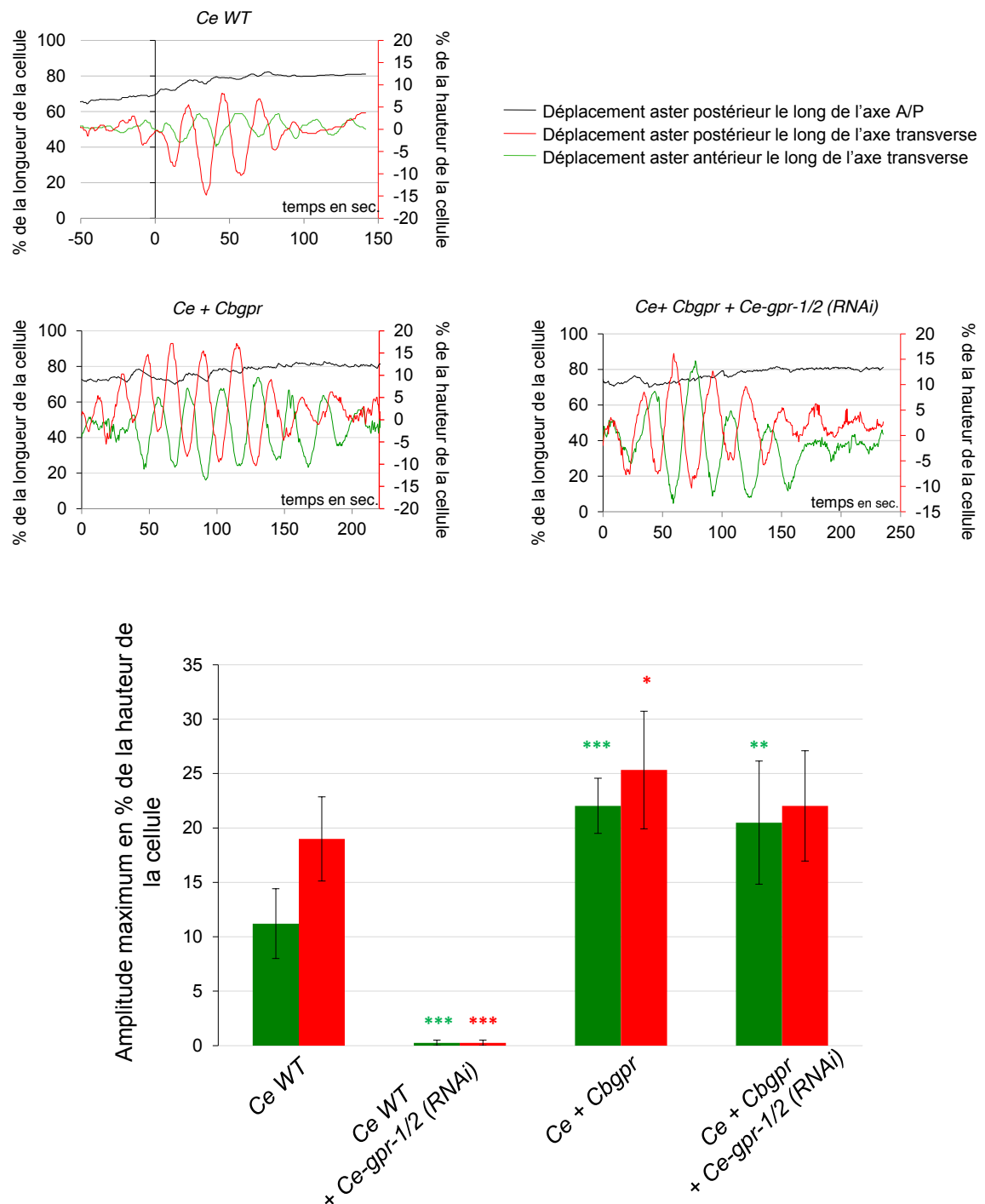


Figure 32: *Cbr-gpr-2* est fonctionnel dans *C. elegans*.

Panel du haut : Représentation des oscillations des centrosomes antérieur (vert) et postérieur (rouge) ainsi que du déplacement du centrosome postérieur le long de l'axe antéro-postérieur.

Panel du bas : Histogramme représentant la moyenne des amplitudes maximales

Vert : Centrosome antérieur ; Rouge : Centrosome postérieur

* : $p < 0.001$; ** : $10^{-5} < p < 0.001$; *** : $p < 10^{-5}$ par rapport à *Ce WT*

Nous avons enfin étudié la dynamique de localisation du transgène. Pour rappel, Ce-GPR-1/2 est enrichie à l'antérieur en prophase et cette localisation est perdue pour un enrichissement postérieur en anaphase. En revanche Cb-GPR-2 reste enrichie à l'antérieur même en anaphase. Dans la lignée *Ce + Cbgpr* le transgène est exprimé pendant toute la durée de la mitose et l'enrichissement est permanent aussi bien au cortex antérieur que postérieur, et ce même en absence de la protéine endogène (Figure 33). La persistance du transgène Cbr-GPR-2 au pôle antérieur est consistant avec une augmentation des oscillations du centrosome antérieur dans la lignée *Ce + Cbgpr*.

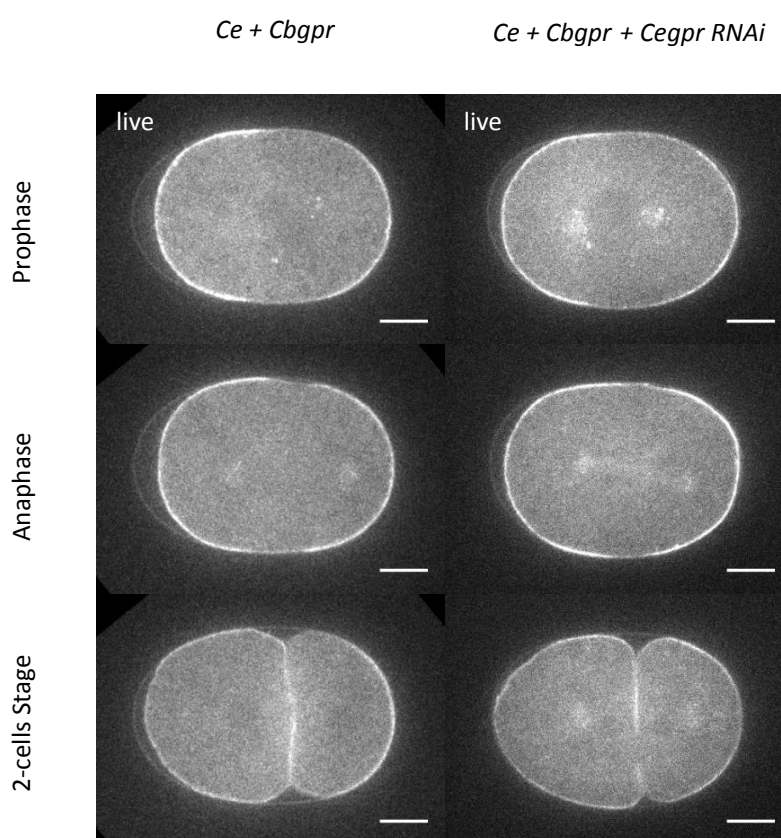


Figure 33: Localisation du transgène GFP::Cbr-GPR-2 dans une lignée *C. elegans*.

Images confocales de la lignée *Ce + Cbgpr* en présence ou non de la protéine Ce-GPR-1/2 endogène.

Dans la lignée *Ce + Cbgpr* le transgène est exprimé pendant toute la durée de la mitose et l'enrichissement est permanent aussi bien au cortex antérieur que postérieur, et ce même en absence de la protéine endogène.

II.A.2. Le phénotype de *Ce + Cbgpr* est identique à celui d'une lignée *Ce + Cegpr*

Nous savons qu'une quantité excessive de Ce-GPR-1/2 est responsable d'une augmentation des oscillations chez *C. elegans*. La lignée TH251 créée par l'équipe d'Anthony Hyman est une lignée de *C. elegans* exprimant un transgène *YFP::Ce-gpr-1* synthétique (voir Matériel et Méthode, Redemann et al., 2011). Ce transgène correspond à une version modifiée du gène *Ce-gpr-1* où certains codons ont été modifiés tout en conservant la séquence finale d'acides aminés. L'indice CAI=0.3 (pour Codon Adaptation Index) est un indice calculé en fonction de la proportion de codons rares dans la séquence. Le transgène exprimé dans la lignée TH251 possède autant de codons rares que le gène *Ce-gpr-1* sauvage. Il a été montré dans cette lignée que l'amplitude des oscillations était deux fois plus élevée aussi bien à l'antérieur qu'au postérieur par rapport aux oscillations des pôles du fuseau d'un embryon *C. elegans* sauvage (Redemann et al., 2011). En analysant cette lignée TH251, que nous appellerons *Ce + Cegpr*, nous avons observé les mêmes conclusions. Les oscillations des centrosomes antérieur et postérieur sont très élevées par rapport aux oscillations du fuseau d'un embryon *C. elegans* sauvage ($23,6 \pm 2,67\%$ vs $11,2 \pm 3,21\%$ pour *C. elegans*; $p=7,75 \cdot 10^{-6}$ pour l'antérieur et $29,6 \pm 3,43\%$ vs $19,0 \pm 3,87\%$ pour *C. elegans* $p=9,04 \cdot 10^{-5}$ pour le postérieur). Comme dans la lignée *Ce + Cbgpr*, le NCC fait du rocking lors de la centration/rotation qui corrélient avec l'augmentation des forces. Nous avons ensuite inactivé le gène endogène par RNAi (qui ne cible pas le transgène synthétique grâce aux modifications de codons). Lorsque l'on inactive *Ce-gpr-1/2* endogène dans *Ce + Cegpr*, comme pour la lignée *Ce + Cbgpr*, les oscillations antérieures restent très fortes alors que les amplitudes du centrosome postérieur redeviennent presque de même amplitude que dans un embryon de *C. elegans* sauvage ($21,2 \pm 4,17\%$ vs $11,2 \pm 3,21\%$ pour *C. elegans*; $p=1,19 \cdot 10^{-6}$ pour l'antérieur et $23,4 \pm 3,42\%$ vs $19,0 \pm 3,87\%$ pour *C. elegans*; $p=0,01$ pour le postérieur) (Figure 34).

Ainsi, que le transgène provienne de l'espèce *C. elegans* ou *C. briggsae*, la présence d'une copie supplémentaire de GPR dans le fond génétique *C. elegans* entraîne une augmentation forte des oscillations, notamment au pôle antérieur de la cellule. Cette expérience nous montre que Cbr-GPR-2 est fonctionnel dans un embryon de *C. elegans* et ne présente finalement pas de phénotype spécifique, différent de Ce-GPR-2.

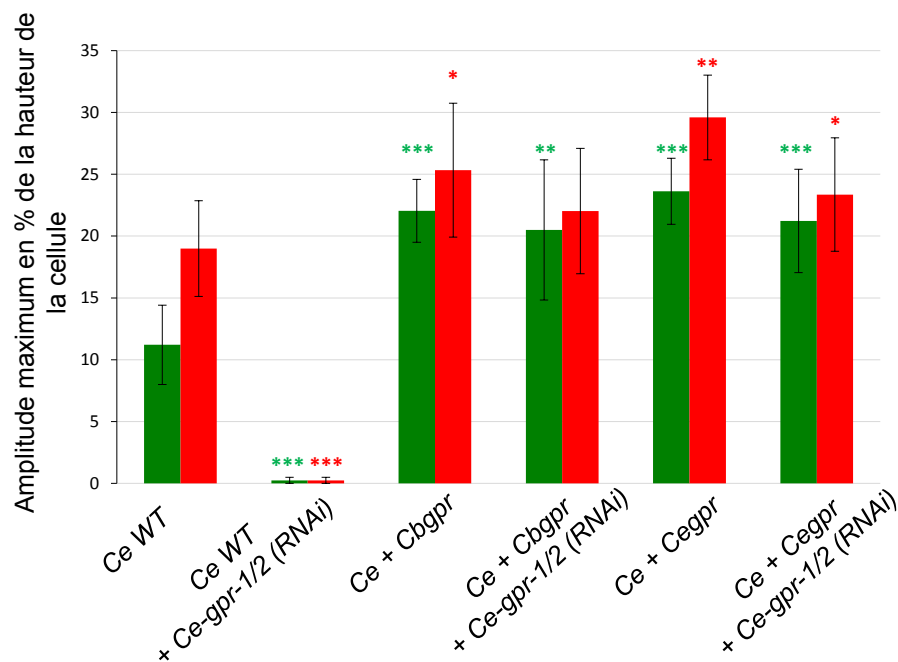


Figure 34 : Le phénotype de *Ce + Cbgpr* est identique à celui d'une lignée *Ce + Cegpr*.

Histogramme représentant la moyenne des amplitudes maximales

Vert : Centrosome antérieur ; Rouge : Centrosome postérieur

* : $p > 0.001$; ** : $p > 10^{-5}$; *** : $p < 10^{-5}$ par rapport à *Ce WT*

II.A.3. *Ce-gpr-2* a un effet dominant négatif dans *C. briggsae*

Nous avons entrepris les mêmes analyses pour la lignée complémentaire, *Cb + Cegpr*, où le gène *gpr* de *C. elegans* est exprimé dans un embryon de *C. briggsae*. Une telle lignée a été obtenue par bombardement de *C. briggsae*. La lignée est viable, et ne présente pas de létalité embryonnaire. Le transgène est bien localisé au cortex comme attendu. La division embryonnaire est asymétrique dans cette lignée. Les amplitudes du centrosome antérieur sont identiques à celles d'embryons sauvages de *C. briggsae* ($5,56 \pm 2,6\%$ et $5,36 \pm 1,4\%$ réciproquement ; $p=0,81$), alors que les amplitudes du centrosome postérieur sont légèrement diminuées ($8,11 \pm 2,16\%$ vs $10,1 \pm 3,10\%$ pour *C. briggsae* ; $p=0,04$). Nous avons ensuite inactivé le gène endogène *Cbr-gpr-2* par RNAi. Dans la lignée contrôle de *C. briggsae*, ce traitement RNAi entraîne la perte totale des oscillations (Figure 35). Dans la lignée *Cb + Cegpr*, nous avons observé également la perte totale des oscillations antérieures et postérieures et la formation de deux cellules filles symétriques (Figure 35). Par conséquent *Ce-GPR-2* ne peut pas remplacer la fonction de la protéine *Cbr-GPR-2* de *C. briggsae*.

Malgré le fait que la protéine ne remplisse pas son rôle lors du positionnement du fuseau, elle se localise quand même au cortex. Bien que le signal semble moins intense que dans la lignée *Ce + Cbgpr*, l'enrichissement cortical du transgène est permanent aussi bien à l'antérieur qu'au postérieur dans les deux lignées, et ce même en absence de la protéine endogène (Figure 36). Il se pourrait que la protéine ait gardé sa capacité à se fixer au cortex mais qu'elle ne puisse pas jouer son rôle dans la génération des forces de traction. Ceci pourrait être dû à une expression trop faible du transgène, entraînant une quantité trop faible de générateurs de forces actifs en mitose. Alternativement, la protéine GPR-2 de *C. elegans* pourrait ne pas être fonctionnelle une fois ancrée au cortex et se comporterait alors comme un dominant négatif. Elle empêcherait alors Cbr-GPR-2 de se fixer dans la lignée où l'endogène est toujours présent, ce qui pourrait expliquer la diminution des oscillations alors même que l'endogène est exprimé.

Nous nous sommes demandé si l'effet dominant négatif de la lignée *Cb + Cegpr* n'était pas dû à la présence d'autres mutations dans le génome de la lignée, suite à la transgénèse par biolistique. Nous l'avons donc rétrocroisée trois fois dans le génome de *C. briggsae*. La lignée rétrocroisée présente les mêmes phénotypes d'oscillations réduites que la lignée non rétrocroisée et l'inactivation de Cbr-GPR-2 entraîne les mêmes défauts : pertes des oscillations et division symétrique. Enfin nous avons également inactivé le transgène afin de vérifier le retour à un phénotype sauvage. Ce qui est le cas. Les amplitudes d'oscillation des pôles antérieur et postérieur sont égales à celles d'un embryon sauvage de *C. briggsae* ($5,78 \pm 2,13\%$ vs $5,36 \pm 1,41\%$; $p=0,64$ pour l'antérieur et $9,63 \pm 3,69\%$ vs $10,1 \pm 3,10\%$; $p=0,73$ pour le postérieur) (Figure 35). Ainsi, les phénotypes observés sont bien dus à la présence du transgène.

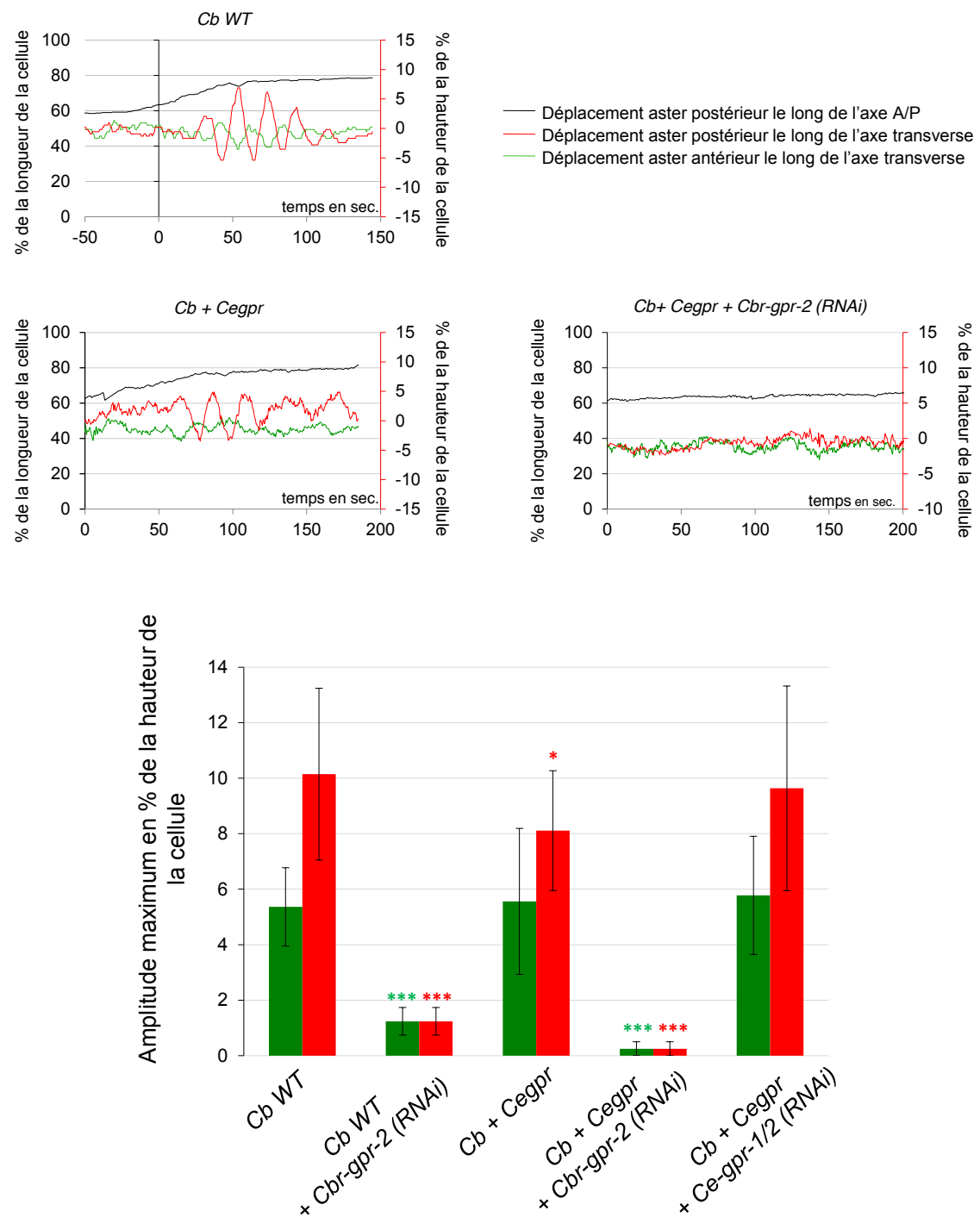


Figure 35: *Ce-gpr-2* a un effet dominant négatif dans *C. briggsae*.

Panel du haut : Représentation des oscillations des centrosomes antérieur (vert) et postérieur (rouge) ainsi que du déplacement du centrosome postérieur le long de l'axe antéro-postérieur.

Panel du bas : Histogramme représentant la moyenne des amplitudes maximales.

Vert : Centrosome antérieur ; Rouge : Centrosome postérieur

* : $p < 0.001$; ** : $10^{-5} < p < 0.001$; *** : $p < 10^{-5}$ par rapport à *Cb WT*

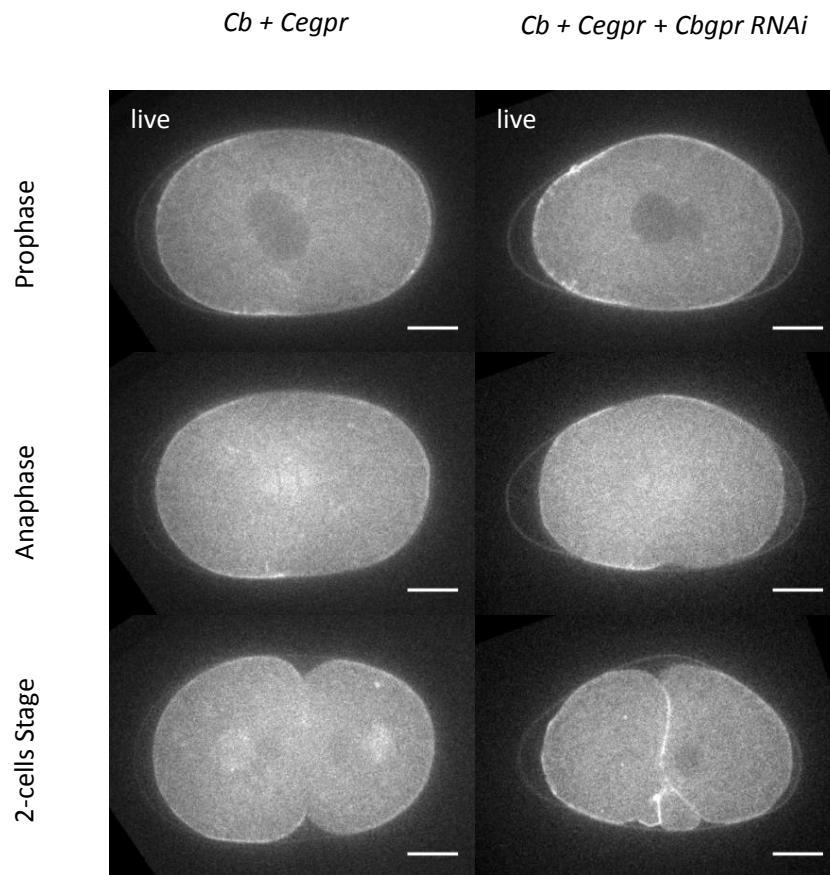


Figure 36 : Localisation du transgène *gfp ::Ce-gpr-2* en présence et en absence de la protéine Cbr-GPR-2 endogène.

Images confocales de la lignée *Cb + Cegpr* en présence ou non de la protéine Cbr-GPR-2 endogène.

Le signal est légèrement moins intense que dans la lignée *Ce + Cbgpr*. L'enrichissement cortical du transgène est permanent aussi bien à l'antérieur qu'au postérieur dans les deux lignées, et ce même en absence de la protéine endogène. En absence de la protéine endogène on observe une division symétrique.

II.A.4. Cb-GPR-2 n'est pas suffisant pour induire de l'overcentration

Nous avons montré dans l'étude précédente que la position du NCC lors de la prophase est plus antérieure chez *C. briggsae* ($45,6 \pm 2,3\%$, $n=37$) comparé à *C. elegans* ($49,1 \pm 2,1\%$, $n=42$). De plus nous avons montré que cette position antérieure est dépendante du complexe ternaire $G\alpha$ /GPR/LIN-5 et corrèle avec l'enrichissement de Cb-GPR-2 au pôle antérieur de la cellule (Riche et al., 2013). Nous avons mesuré la position du NCC en prophase dans les lignées de remplacement de gène. Dans la lignée *Ce* + *Cbgpr* il y a une centration qui est statistiquement égale à la position du NCC dans un embryon *C. elegans* ($n=11$, $47,5 \pm 2,6\%$ vs $49,1 \pm 2,1\%$ pour *C. elegans*; $p=0,08$) mais lorsque seul le transgène est exprimé, c'est-à-dire seulement *Cbr-gpr-2*, il y a une overcentration ($n=12$, $45,1 \pm 3,1\%$ vs $49,1 \pm 2,1\%$ pour *C. elegans*, $p=8,4.10^{-4}$) (Figure 38). Ainsi, lorsque la protéine GPR provient de *C. briggsae*, cela provoque une overcentration du NCC. Cependant, la protéine n'est pas suffisante pour provoquer l'overcentration lorsque la protéine Ce-GPR-1/2 est également présente dans la cellule. Ceci pourrait refléter une compétition entre les protéines GPR transgéniques et endogènes au niveau du complexe responsable de la traction des microtubules. Ainsi, en présence de la protéine endogène, Cbr-GPR-2 ne serait pas assez forte pour induire l'overcentration dans un fond génétique *C. elegans* alors qu'en absence de l'endogène tous les sites sont disponibles pour Cbr-GPR-2.

Dans la lignée *Cb* + *Cegpr* on observe une overcentration et la position du NCC est statistiquement différente de celle du NCC chez *C. elegans* ($n=15$, $46,8 \pm 1,6\%$, $p=1,2.10^{-4}$). En revanche, cette position antérieure du NCC n'est pas aussi marquée que pour la souche contrôle de *C. briggsae* ($p=0,047$). De plus, cette overcentration est perdue lorsque seul le transgène *Ce-gpr-2* est exprimé et la position du NCC est statistiquement égale à celle de *C. elegans* ($n=5$, $49,7 \pm 1,8\%$, $p=0,53$). Enfin nous avons analysé la lignée *Cb* + *Cegpr* après inactivation du transgène. On retrouve une overcentration très marquée ($n=10$, $43,3 \pm 1,8\%$) (Figure 37). Le fait que l'overcentration soit moins marquée chez *Cb* + *Cegpr* alors qu'elle est très forte lorsque le transgène est inactivé va dans le sens d'un effet dominant négatif de la part de GFP::Ce-GPR-2. Toutefois, on ne peut pas à ce stade exclure que l'absence d'overcentration induit par le transgène *Ce-gpr-2* ne soit pas due à un niveau d'expression trop faible du transgène.

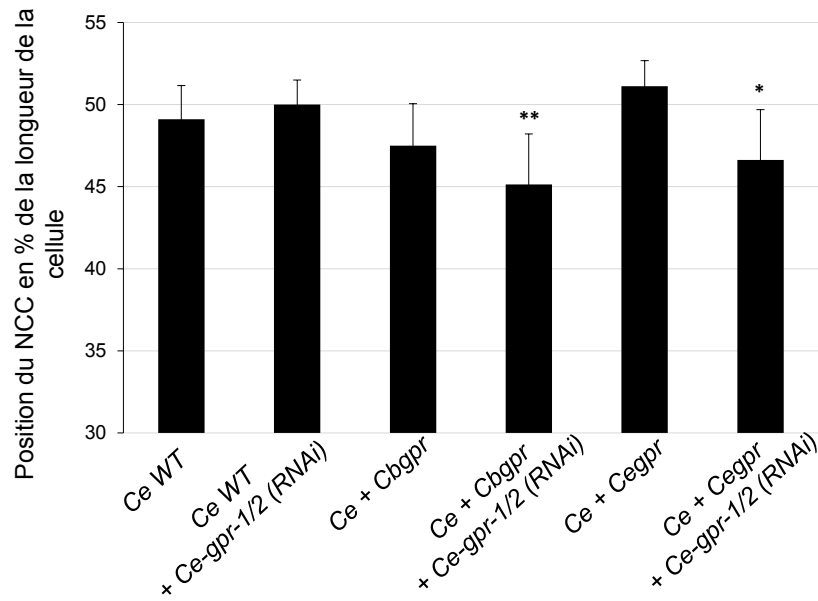


Figure 38: Cb-GPR-2 n'est pas suffisant pour induire de l'overcentration.

Histogramme de la position moyenne la plus antérieure du NCC après la fin de la centration/rotation.

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.001$ par rapport à Ce WT

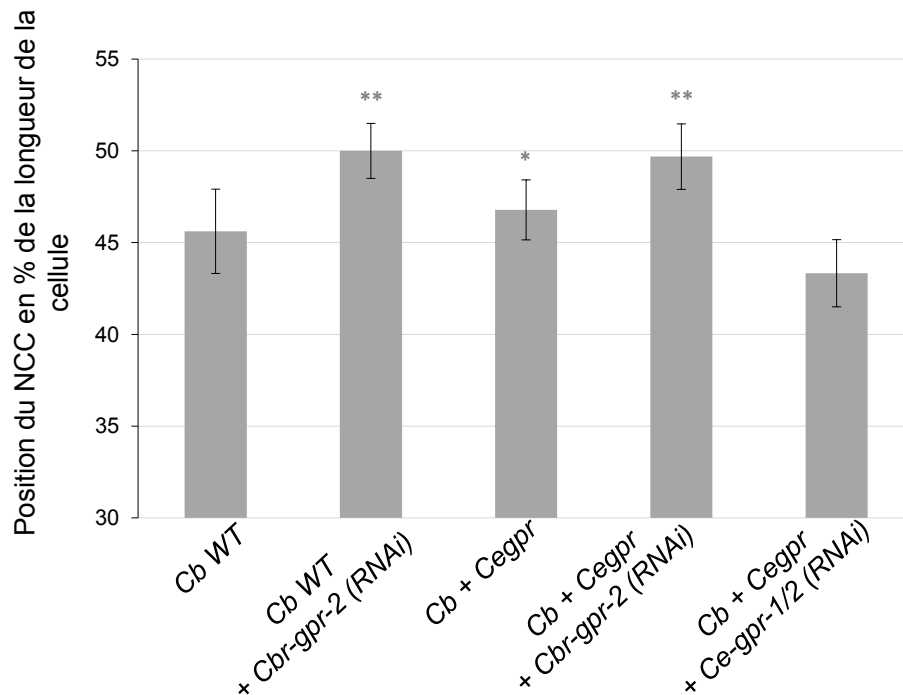


Figure 37: L'effet dominant négatif de Ce-GPR-2 affecte l'overcentration dans *C. briggsae*.

Histogramme de la position moyenne la plus antérieure du NCC après la fin de la centration/rotation.

* : $p > 0.05$; ** : $p > 10^{-5}$ par rapport à Cb WT

II.A.5. Les protéines GPR et LIN-5 semblent avoir co-évolué dans les deux espèces

Malgré leur grande divergence en acides aminés, les protéines GPR des deux espèces possèdent toujours un domaine TPR et un domaine Goloco, qui doivent leur permettre d'interagir avec LIN-5 et $G\alpha$ respectivement. Il se pourrait qu'une pression de sélection permette la maintenance de ces interactions au sein de chacune des espèces, par un mécanisme de co-évolution des protéines. En revanche, les divergences accumulées pourraient empêcher les interactions avec les orthologues d'une autre espèce. Par exemple, Ce-GPR-1/2 interagirait avec Ce-LIN-5 et Cbr-GPR-2 avec Cbr-LIN-5 mais la protéine Ce-GPR-1/2 ne serait plus capable d'interagir avec Cbr-LIN-5. Pour tester cette hypothèse sur la divergence protéique, nous avons testé si la protéine Ce-GPR-1 était capable d'interagir avec la protéine Cbr-LIN-5 en double hybride et inversement. Il a déjà été montré que Ce-GPR-1 interagit avec Ce-LIN-5 en double hybride (Fisk Green et al., 2004). Les plasmides permettant de tester l'interaction Ce-GPR-1/Ce-LIN-5 nous ont été donnés par Sander van den Heuvel. J'ai construit en respectant les mêmes conditions les plasmides permettant de tester cette interaction pour les protéines de *C. briggsae*. Des levures ont ensuite été co-transformées avec un plasmide appât exprimant l'un des GPR et un plasmide proie contenant l'un des LIN-5 dans toutes les combinaisons possibles. Nos expériences permettent de reproduire l'interaction Ce-GPR-1 avec Ce-LIN-5 et de montrer également que Cbr-GPR-2 interagit avec Cbr-LIN5. En revanche, Ce-LIN-5 n'interagit pas avec Cbr-GPR-2 et inversement. Ces résultats suggèrent une co-évolution des molécules du complexe générateur de force, et une divergence entre espèce empêchant les interactions (Figure 39).

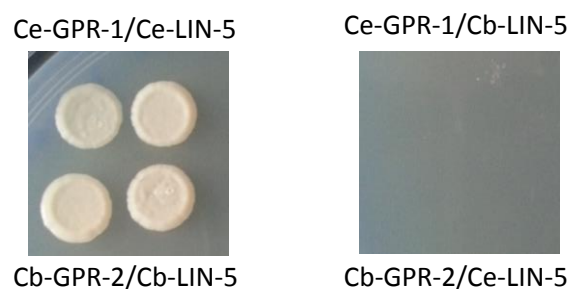


Figure 39 : Les protéines GPR et LIN-5 semblent avoir co-évolué dans les deux espèces.

L'interaction Cbr-GPR-2/Cbr-LIN-5 a pu être démontrée en double hybride comme il l'avait été pour Ce-GPR-1/Ce-LIN-5.

En revanche Cbr-GPR-2 n'interagit pas avec Ce-LIN-5 ni Ce-GPR-1 avec Cbr-LIN-5.

II.A.6. Les transgènes peuvent se localiser sans la protéine LIN-5 endogène

Nous avons vu que les transgènes sont localisés corticalement dans la lignée *Ce + Cbgpr* comme dans la lignée *Cb + Cegpr*. En 2003, deux équipes ont montré que Ce-GPR-1/2 a besoin de Ce-LIN-5 pour être ancré au cortex (Gotta et al., 2003; Srinivasan et al., 2003). Or, nous avons constaté dans des embryons de *C. briggsae* que l'absence de Cbr-LIN-5 n'empêchait pas la localisation corticale de Cbr-GPR-2 (Figure 40).

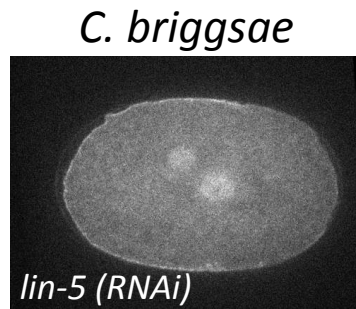


Figure 40: Localisation de GFP ::Cbr-GPR-2 dans un contexte *lin-5 (RNAi)*

Image confocale d'une lignée de *C. briggsae* exprimant GFP ::Cbr-GPR-2. Le signal de GFP ::Cbr-GPR-2 est toujours présent au cortex lorsque *lin-5* est inactivée.

De la même manière, lorsque *lin-5* endogène est inactivé par RNAi dans *Cb + Cegpr* ou *Ce + Cbgpr*, nous observons un phénotype *lin-5* mutant marqué comme attendu. Le globule polaire qui est exclu est anormalement gros, et les forces de traction du fuseau sont inhibées. Les oscillations du fuseau sont donc absentes et la division est symétrique (Figure 41).

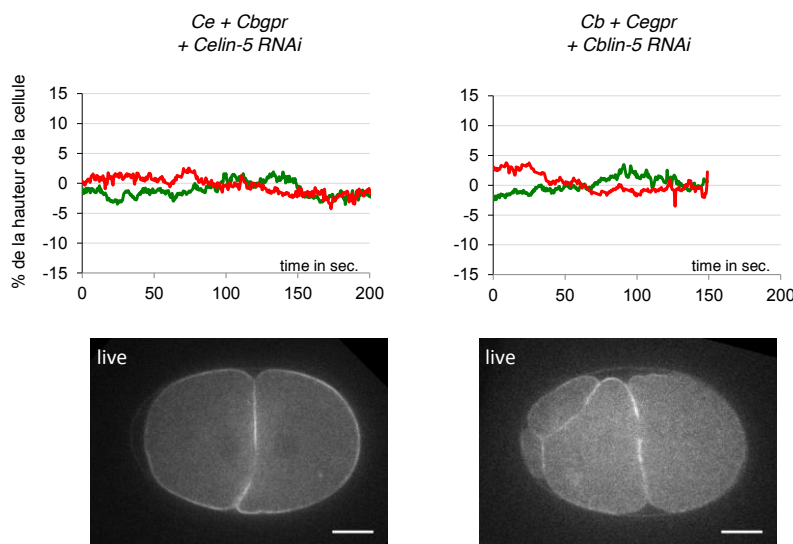


Figure 41: Cbr-GPR-2 a besoin de la protéine Ce-LIN-5 endogène pour jouer son rôle dans la génération des forces de traction.

Lors de l'inactivation de *lin-5*, on observe la perte des oscillations du pôle antérieur (vert) et du pôle postérieur (rouge).

Images confocales de la lignée *Cb + Cegpr + Cbr-lin-5 (RNAi)* et *Ce + Cbgpr + Ce-lin-5 (RNAi)*. La division est symétrique, les transgènes sont toujours localisés au cortex.

Cependant, malgré ces phénotypes forts, on remarquera que les transgènes sont encore localisés au cortex dans les deux cas. Ceci suggère que les transgènes GFP::GPR n'ont pas besoin des protéines LIN-5 endogènes pour atteindre le cortex (Figure 41). Ceci est en accord avec les résultats de double hybride : malgré une impossibilité d'interaction des transgènes GPR avec les protéines LIN-5 endogènes, leur localisation n'est pas compromise. Cependant nous avons vu que Cbr-GPR-2 est fonctionnelle dans un embryon de *C. elegans*, et que dans la lignée *Ce + Cbgpr*, le transgène seul est incapable de générer les forces de traction lorsque *Ce-lin-5* est inactivé. Ceci indique que Cbr-GPR-2 a besoin de la protéine *Ce-LIN-5* endogène pour jouer son rôle dans la génération des forces de traction. Ceci est en contradiction avec l'analyse des interactions GPR/LIN-5 par double hybride.

II.A.7. Quantification de l'expression des transgènes dans chaque lignée

La fonction de GPR étant dose-dépendante, il est important de vérifier si le niveau d'expression des transgènes est identique entre nos lignées de remplacement. Ceci nous permettra de vérifier que les différences de phénotype ne sont pas dues à des différences d'expression des transgènes. Les deux lignées ont été créées par des techniques de transgénèse différentes. La lignée *Ce + Cbgpr* a été obtenue par microinjection avec la technique du MosSCI (Robert et al., 2009). Cette technique assure l'insertion d'une seule copie du gène d'intérêt dans une région connue du génome. En revanche la lignée *Cb + Cegpr* a été obtenue par biolistique. Cette technique ne permet pas de contrôler le nombre de copie du gène mais elle assure quand même un faible nombre de copie (entre 10 et 100) et ne permet pas non plus de contrôler le site d'insertion du transgène (Hochbaum et al., 2010). Les gènes exprimés dans la lignée germinale sont très souvent soumis au phénomène de "silencing". Ce mécanisme est un mécanisme de défense qui inhibe fortement les transgènes multi-copies et/ou les transgènes exogènes afin de protéger l'intégrité du génome dans la lignée germinale. Un gène exprimé en faible copie a une probabilité plus forte d'échapper à ce mécanisme et de pouvoir être exprimé dans la lignée germinale. Ainsi, du fait du nombre de copies différent entre les lignées, du silencing des transgènes que nous ne pouvons pas contrôler, et de l'importance de la quantité de protéine totale sur les processus que nous regardons, nous avons vérifié par western blot que les deux lignées expriment un taux de protéine similaire (Figure 42).

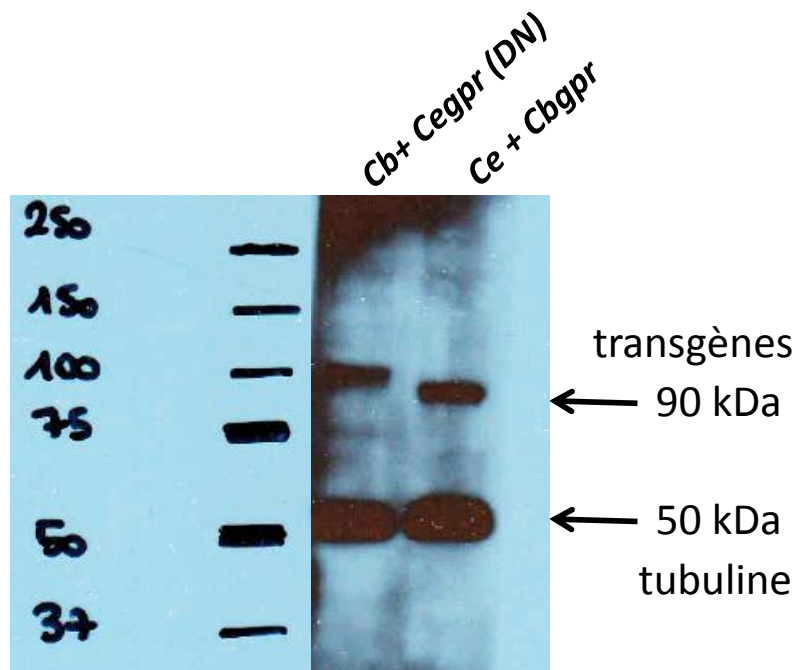


Figure 42: Quantification de l'expression des transgènes dans chaque lignée.

Quantification par Western Blot de la quantité de transgène GFP ::Ce-GPR-2 et GFP :: Cbr-GPR-2 par une anti-GFP (Roche). Les transgènes mesurent chacun 89 kDa. La tubuline est utilisée comme contrôle de charge. L'expression des transgènes est similaire en revanche on observe un décalage de taille. Le transgène GFP ::Ce-GPR-2 n'a pas la taille attendue.

Les transgènes étant fusionnés tous deux à la GFP, nous avons réalisé des western blot pour détecter la quantité de GFP dans les deux lignées. Les résultats nous montrent que les quantités de transgènes sont sensiblement similaires. Nous ne pouvons donc probablement pas attribuer les différences de phénotype à des niveaux d'expression différents entre souches. En revanche nous observons un net décalage entre la taille attendue pour le transgène GFP ::Ce-GPR-2 par rapport à celui GFP ::Cbr-GPR-2 alors que les deux transgènes ont une taille de 89kDa (Figure 42). Nous avons fait l'hypothèse d'un problème d'épissage des introns. Le séquençage de l'ADNc de *GFP ::Ce-gpr-2* confirme l'absence des introns et donc un épissage correct du transgène. En revanche, le séquençage de l'ADNg a révélé un oubli du codon stop à la fin de la séquence de *gpr-2*. Ainsi 4 acides aminés sont ajoutés en plus à la fin de la séquence : TSGS, avant qu'il n'y ait un codon stop. Cette mutation n'explique pas le problème de taille du transgène observé en western blot mais elle pourrait expliquer le comportement dominant négatif du transgène dans la lignée *Cb + Cegpr*.

II.B. Création de protéines chimères

En parallèle au projet de remplacement de gène, j'avais déjà entrepris l'étude des domaines de régulation des protéines GPR par la création de protéines chimères, avant la découverte de la mutation du transgène *Ce-gpr-2*. Afin d'identifier les domaines divergents entre espèces j'ai construit des lignées exprimant des formes chimères de la protéine GPR. J'ai construit un plasmide permettant l'expression d'un gène composé de la partie Nter de *Cbr-gpr-2* et de la partie Cter de *Ce-gpr-2* par PCR fusion. Ce gène a ensuite été fusionné au niveau de sa partie Nter à la GFP et placé sous le contrôle du promoteur *Ce-pie-1*. La construction inverse a été réalisée par la société Genscript. J'ai ensuite fusionné le gène à la GFP toujours au niveau Nter de la séquence du gène et sous contrôle du promoteur *Ce-pie-1* (Figure 43).

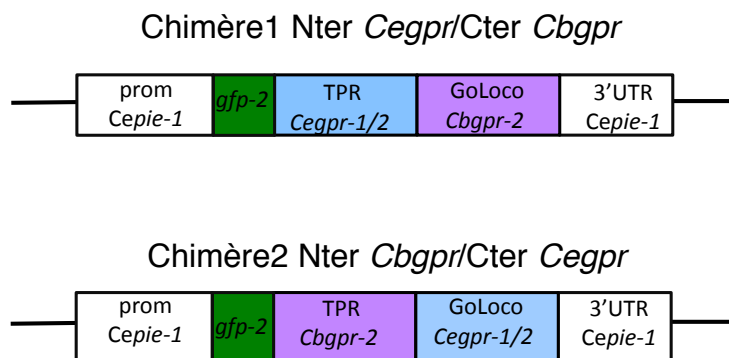


Figure 43 : Schéma des construits réalisés pour exprimer des protéines chimères.

Chimère 1 : Nter *Cegpr*/Cter *Cbgpr*

Chimère 2 : Nter *Cbgpr*/Cter *Cegpr*

La GFP est placée en Nter.

Les transgènes sont placés sous contrôle du promoteur *Ce-pie-1*.

De la même manière que pour les expériences de remplacement de gène, nous avons cherché à analyser les phénotypes associés aux domaines protéiques exprimés. Par exemple si les protéines chimères présentent des phénotypes différents de ceux des lignées de remplacement alors nous pourrions identifier plus précisément les domaines essentiels pour l'overcentration, ou alors savoir si certains domaines régulent la localisation des transgènes.

Chaque construit a été utilisé pour transformer chacune des espèces. Les gènes endogènes ont ensuite été inactivés par RNAi en ciblant la partie qui n'est pas commune entre le transgène et le gène endogène. J'ai donc créé plusieurs plasmides de RNAi ciblant soit la partie Nter de *Ce-gpr-2* ou *Cbr-gpr-2* soit la partie Cter et ai vérifié que chacun des construits était suffisant pour induire l'inactivation des protéines endogènes dans les souches sauvages de *C. elegans* et *C. briggsae*.

Seules deux lignées transgéniques ont pu être générées : *C. elegans* + *Nter-Cb/Cter-Ce-gpr* (*Ce* + *Cb/Ce-gpr*) par la technique de MiniMos et *C. briggsae* + *Nter-Cb/Cter-Ce-gpr* (*Cb* + *Cb/Ce-gpr*) par la technique de bombardement (Figure 44).

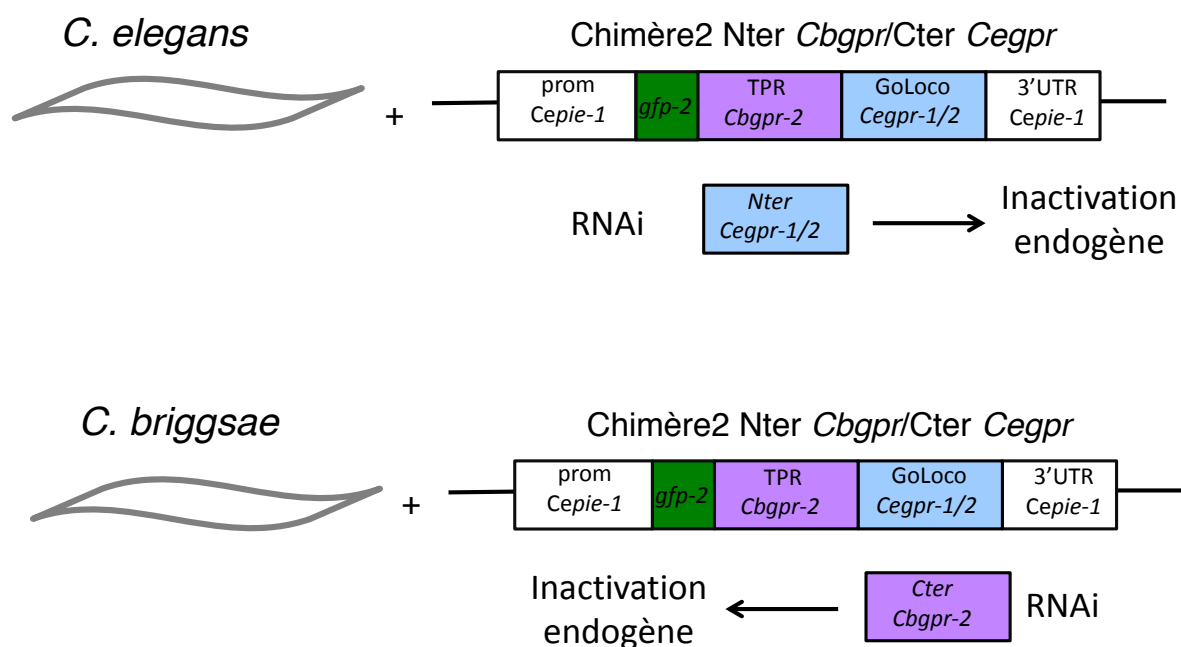


Figure 44 : Création des lignées exprimant les protéines chimères

La protéine Chimère n°2 (*Nter Cbgpr/Cter Cegpr*) a été insérée dans chacune des espèces. Pour inactiver le gène *gpr* endogène dans *C. elegans*, la partie Nter du gène sera ciblée alors que pour inactiver le gène *gpr* endogène dans *C. briggsae*, la partie Cter du gène sera ciblée.

II.B.1. *Nter-Cb/Cter-Ce-gpr* est fonctionnel dans *C. elegans*

J'ai analysé les mouvements des pronoyaux et du fuseau mitotique dans ces deux lignées. Lorsque le transgène *Nter-Cb/Cter-Ce-gpr* est exprimé dans *C. elegans*, les amplitudes des oscillations des pôles antérieur et postérieur sont augmentées par rapport à un embryon *C. elegans* sauvage ($24,4 \pm 3,34\%$ pour l'antérieur ; $p=5,35.10^{-11}$ et $27,1 \pm 4,88\%$ pour le postérieur ; $p=6,14.10^{-5}$). Ce transgène se comporte donc comme les autres transgènes dans *C. elegans*. On observe toujours de fortes oscillations à l'antérieur et ce même lorsque seul le transgène est exprimé ($20,7 \pm 3,88\%$ pour l'antérieur ; $p=5,57.10^{-6}$ et $22,1 \pm 2,55\%$ pour le postérieur ; $p=0,020$). La division est également toujours asymétrique (Figure 45).

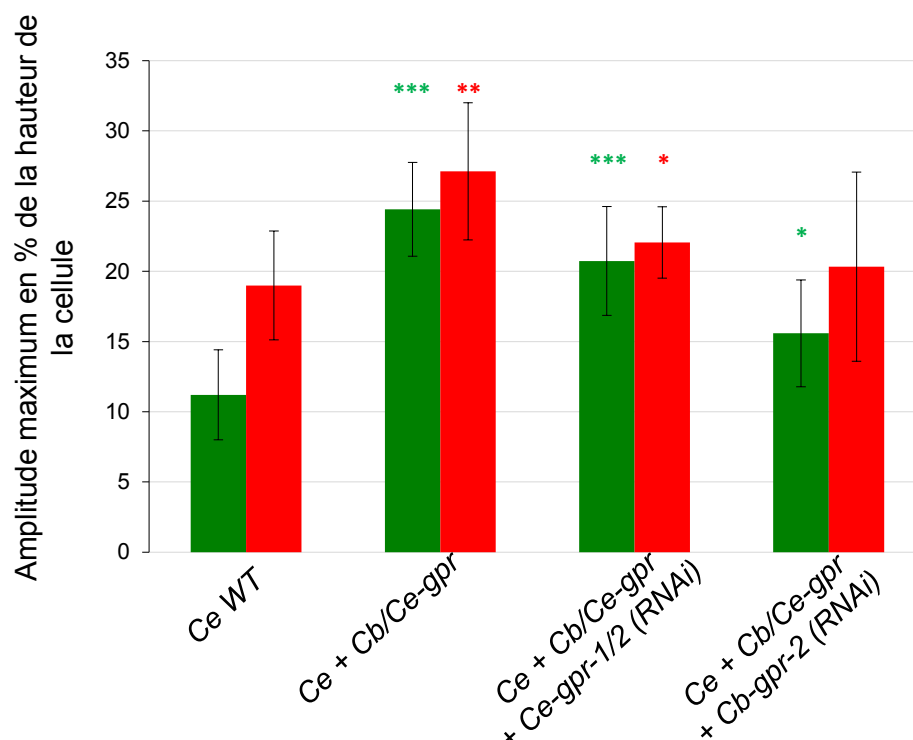


Figure 45 : *Nter-Cb/Cter-Ce-gpr* est fonctionnel dans *C. elegans*.

Histogramme représentant la moyenne des amplitudes maximales.

Vert : Centrosome antérieur ; Rouge : Centrosome postérieur

* : $p < 0.001$; ** : $10^{-5} < p < 0.001$; *** : $p < 10^{-5}$

II.B.2. *Nter-Cb/Cter-Ce-gpr* n'a pas l'effet dominant négatif de *Ce-gpr-2* dans *C. briggsae*

De la même manière, l'expression du même transgène exprimé cette fois chez *C. briggsae* montre des résultats similaires. Les pôles antérieur et postérieur oscillent plus fort que dans un embryon sauvage de *C. briggsae* ($8,01 \pm 1,73\%$ pour l'antérieur ; $p=0,001$ et $16,0 \pm 4,28\%$ pour le postérieur ; $p=0,006$) (Figure 46). Il semble donc que le transgène n'a pas l'effet dominant négatif de *Ce-gpr-2* dans *C. briggsae*. Ainsi l'effet dominant négatif observé chez *Cb + Cegpr* pourrait provenir de la partie *Nter* de *Ce-gpr-2*. Cependant nous avons trouvé une addition de 4 acides aminés dans le transgène *gfp::Ce-gpr-2* (voir § II.A.7.). Or, cette mutation n'est pas présente dans le transgène *Nter-Cb/Cter-Ce-gpr*. Nous ne pouvons donc pas conclure sur la comparaison des phénotypes obtenus entre la lignée *Cb + Cegpr* et la lignée *Cb + Nter-Cb/Cter-Ce-gpr*. De plus, je n'ai pas pu tester avec certitude la fonctionnalité du transgène. La lignée *Cb + Nter-Cb/Cter-Ce-gpr* n'est pas naturellement sensible au RNAi par ingestion et je n'ai pas réussi à obtenir une lignée *Cb + Nter-Cb/Cter-Ce-*

gpr exprimant de manière stable le gène *Ce-sid-2* indispensable pour le RNAi par ingestion chez *C. briggsae* (voir Matériel et Méthode §-I). Par manque de temps, je n'ai pas pu réaliser les expériences de RNAi par injection. Je n'ai donc pas pu tester l'expression du transgène en absence du gène endogène.

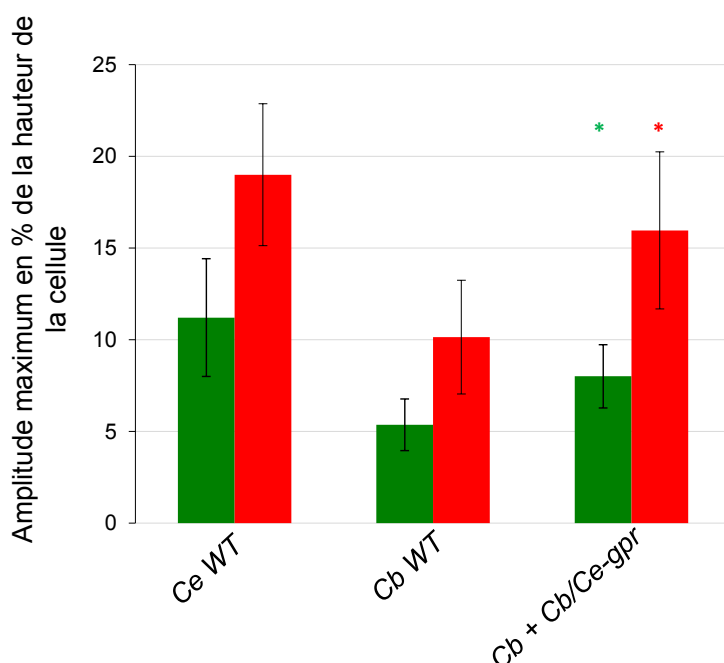


Figure 46 : *Nter-Cb/Cter-Ce-gpr* n'a pas l'effet dominant négatif de *Ce-gpr-2* dans *C. briggsae*.

Histogramme représentant la moyenne des amplitudes maximales.

Vert : Centrosome antérieur ;

Rouge : Centrosome postérieur

* : $p < 0.001$; ** : $10^{-5} < p < 0.001$;

*** : $p < 10^{-5}$

Enfin, j'aurais voulu pouvoir exprimer la protéine chimère n°1 *Nter-Ce/Cter-Cb-GPR* au moins dans *C. briggsae* pour pouvoir conclure sur l'effet dominant négatif. Si nous avions retrouvé un effet dominant négatif dans la lignée *Cb + Nter-Cb/Cter-Ce-gpr*, cela aurait confirmé l'implication de la partie *Nter* de *Ce-gpr-2* dans cet effet. Mais je n'ai pas réussi à créer cette lignée malgré de nombreuses tentatives.

II.B.3. L'Overcentration pourrait dépendre de la partie *Cter* de *Cb-GPR-2*

Dans les lignées *Ce + Cb/Ce-gpr* et *Ce + Cb/Ce-gpr + RNAi Ce-gpr Nter* (après inactivation de l'endogène), il y a une centration ($48,01 \pm 2,89$ % $p=0,28$ et $49,1 \pm 3,43$ % $p=0,96$ respectivement par rapport à *C. elegans*). Après inactivation du transgène (RNAi *Cb-gpr Nter*) on retrouve aussi une centration ($50,0 \pm 2,36$ % $p=0,38$ par rapport à *C. elegans*) (Figure 47). Ces résultats sont différents de ce que l'on observe pour la position du NCC dans les lignées où le transgène *Cb-gpr2* est complet (*Ce + Cbgpr + RNAi Cegpr*). Dans la lignée *Ce + Cbgpr* il y a une centration comme pour *Ce + Cb/Ce-gpr*. Mais lorsque seuls les transgènes sont exprimés dans la lignée *Ce + Cbgpr + RNAi Cegpr* il y a une overcentration (Figure 47).

Ceci pourrait suggérer que la partie Cter de *Cbgrpr* est importante pour l'overcentration du NCC. Il faudrait exprimer le transgène inverse *Ce/Cb-gpr* dans *C. elegans* pour confirmer cette hypothèse et voir si on retrouve une overcentration lorsque seul le transgène est exprimé.

Enfin, pour la lignée *Cb + Cb/Cter-Cegpr*, le NCC se positionne à $47,2 \pm 2,15$ % ($p=0,064$ par rapport à *C. briggsae*) mais aucune conclusion ne peut être faite sans l'analyse de la lignée exprimant uniquement le transgène.

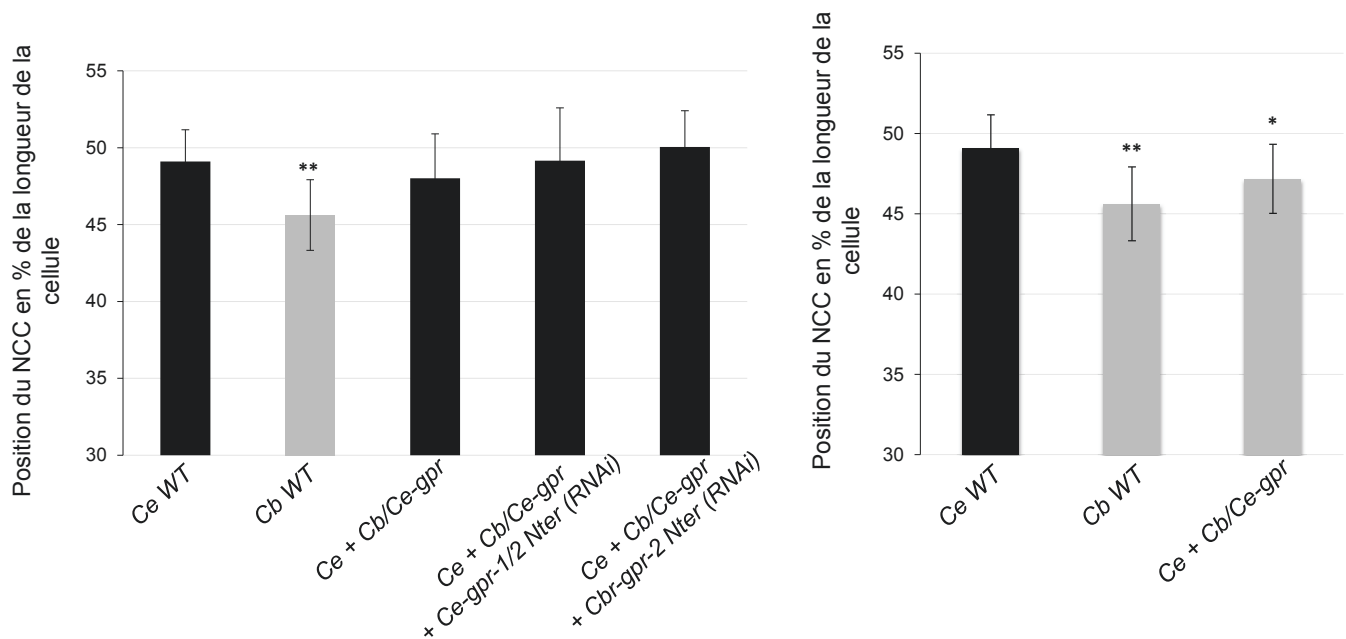


Figure 47 : L'overcentration pourrait dépendre de la partie Cter de Cb-GPR-2.

Histogramme de la position moyenne la plus antérieure du NCC après la fin de la centration/rotation.

* : $p > 0.001$; ** : $p > 10^{-5}$ histogramme du haut par rapport à *Ce WT*, histogramme du bas par rapport à *Cb WT*

III. Discussion

Nous avons analysé des lignées de remplacement de gène dans le but d'identifier des différences de régulation entre les protéines GPR de *C. elegans* et *C. briggsae*. Les lignées présentent des phénotypes différents entre elles et différents des souches sauvages correspondantes. Nous avons vérifié que les différences n'étaient pas dues à une différence majeure dans le niveau d'expression du transgène, GPR ayant une action dose-dépendante. Nous avons remarqué cependant que d'une part le transgène *Ce-gpr-2* codait pour une protéine qui n'avait pas la taille attendue. De plus, ce transgène possède 12 nucléotides en trop dans sa partie Cter, qui rajoute 4 acides aminés TSGS. Cette différence dans la séquence d'acides aminés n'explique cependant pas la différence de taille des protéines. L'insertion de ces quelques nucléotides dans la séquence du gène *Ce-gpr-2* était présente dans le plasmide d'origine, utilisé au tout début du projet. La vérification de cette séquence complète aurait dû être faite dès le démarrage du projet. Le domaine Cter de la protéine sert normalement à l'interaction avec Gα pour la localisation au cortex. Nous avons vu pourtant que la protéine se localise au cortex malgré cette mutation. Ils pourraient cependant conférer des changements dans la régulation de la protéine, notamment parce que les sérines et les thréonines pourraient être de nouveaux sites de phosphorylation et donc de régulation. En accord avec cette hypothèse, nous avons observé que ce transgène a un effet dominant négatif dans la lignée *C. briggsae*. Il se pourrait que la protéine ait gardé sa capacité à se fixer au cortex mais qu'elle ne puisse pas jouer son rôle dans la génération des forces de traction. Il serait indispensable de refaire l'analyse de la lignée *Cb + Cegpr* avec un transgène non muté.

Ce problème a été découvert trop tard pendant ma thèse et m'a empêchée de conclure sur beaucoup de résultats de mes expériences, notamment sur les lignées chimères. Cependant, certains résultats restent exploitables et sont discutés ci-dessous.

III.A. Suractivation des oscillations du centrosome antérieur dans *C. elegans*

Nous savons que *gpr* est un gène dose-dépendant. L'analyse des mutants pour un seul des deux gènes de *gpr* dans *C. elegans* montre que les amplitudes d'oscillation du fuseau sont plus faibles, alors que la surexpression graduelle entraîne des plus fortes oscillations et forces de traction (Redemann et al., 2011; Riche et al., 2013). Nous avons

montré que chez *C. elegans*, l'expression d'un transgène contenant un gène *gpr* conduit à la suractivation des oscillations du fuseau et ce indépendamment de l'espèce d'où provient le transgène. Ceci suggère fortement que les phénotypes observés dans la lignée *Ce + Cbgpr* ne sont pas spécifiques à *Cbr-gpr-2* mais reflètent la surexpression de GPR dans la cellule. Ceci suggérerait donc que la protéine GPR de *C. elegans* peut être remplacée par la protéine de Cbr-GPR-2, et qu'il n'y a pas de changements de régulation entre elles. Il serait essentiel de quantifier le niveau d'expression du transgène par rapport à l'endogène dans la lignée *Ce + Cbgpr* et dans la lignée *Ce + Cegpr* pour le confirmer.

Les oscillations du pôle postérieur sont augmentées dans les lignées *Ce + Cbgpr* et *Ce + Cegpr*. Toutefois, la différence d'amplitude n'est pas aussi marquée que pour le pôle antérieur. De plus, lorsque seul le transgène est exprimé, l'amplitude des oscillations postérieures redevient similaire à celles d'une souche *C. elegans* sauvage. Nous savons qu'il existe un seuil impliquant la quantité de protéine totale pour l'initiation des oscillations. Nous savons aussi qu'au-delà d'un certain seuil de processivité, tous les moteurs tirent avec la même intensité sur les microtubules ce qui entraîne l'arrêt des oscillations. Mais il existe peut-être un autre seuil, différent de celui atteint lorsque tous les moteurs sont activés, qui permet de contrôler l'amplitude maximum que peut effectuer le centrosome. Dans les lignées *Ce + Cbgpr* et *Ce + Cegpr* ce seuil est peut être atteint très rapidement pour le centrosome postérieur. Ainsi les amplitudes des oscillations sont fortes très rapidement mais ne dépassent pas 30% de la hauteur de l'embryon malgré une durée des oscillations plus longue (la durée des oscillations régulant également l'amplitude des oscillations). Pour le centrosome antérieur dont les oscillations sont initialement plus faibles, l'augmentation des moteurs aurait alors un effet plus visible sur les oscillations. Le génome de *C. elegans* possédant deux copies du gène *gpr*, on peut imaginer que les embryons expriment naturellement un seuil élevé de protéine GPR. Le rajout d'un transgène, même en faible quantité pourrait facilement, dans ce contexte, avoir un effet drastique sur les oscillations.

Nous avons observé que les deux transgènes sont localisés au cortex antérieur et postérieur de l'embryon durant tout le cycle cellulaire. Ce qui ne correspond pas à la dynamique de localisation que les protéines adoptent dans leur fond génétique sauvage respectif. En effet, dans aucune espèce la protéine n'est enrichie au cortex postérieur dès la prophase. Cette localisation n'apparaît qu'en métaphase. De plus, bien que dans les deux espèces GPR soit enrichie au cortex antérieur (avec un enrichissement plus fort pour

C. briggsae) en prophase, seul *C. briggsae* maintient cet enrichissement pendant la suite de la division (Riche et al., 2013). Dans la lignée *Ce + Cbgpr*, en prophase l'enrichissement antérieur du transgène corrèle avec les mouvements anormaux du NCC qui suggèrent une augmentation des forces de traction par rapport à la souche sauvage *C. elegans*. Toutefois, l'enrichissement d'une protéine n'est pas forcément corrélé avec sa fonction. Nous avons déjà montré que Cbr-GPR-2 est inactive à l'antérieur en anaphase dans *C. briggsae* malgré le maintien de cette protéine au cortex (Riche et al., 2013). Mais au vu des phénotypes observés il semble que dans *C. elegans* elle ne soit pas réprimée à l'antérieur. Ainsi il pourrait manquer un inhibiteur du complexe générateur de force agissant à l'antérieur chez *C. elegans* expliquant ces fortes oscillations antérieures à chaque fois qu'un transgène *gpr* est exprimé.

En ce qui concerne la lignée *Cb + Cegpr*, on observe la même dynamique de localisation que dans la lignée *Ce + Cbgpr*. Cependant, en raison de l'effet dominant négatif de Ce-GPR-1 chez *C. briggsae*, même s'il y a une accumulation à l'extrémité antérieure pendant la prophase, il n'y a aucun effet sur les mouvements du NCC, ni sur les mouvements du fuseau en anaphase. Il est possible que le mécanisme par lequel Cbr-GPR-2 est inhibée dans *C. briggsae* fonctionne efficacement sur Ce-GPR-2. De plus, lorsque le transgène *Cb/Cegpr* est exprimé dans *C. briggsae*, les amplitudes du pôle antérieur sont légèrement augmentées mais elles sont loin d'égaler celles du pôle postérieur comme dans une souche *C. elegans*, ce qui soutient l'hypothèse d'une inhibition antérieure. Il se pourrait que lorsque Ce-GPR-2 est exprimée dans *C. briggsae*, la protéine a une meilleure affinité pour l'inhibiteur conduisant à une perte complète des oscillations.

III.B. L'overcentration pourrait être contrôlée par un domaine de Cb-GPR-2

Nous avons vu que l'expression de la protéine Cbr-GPR-2 n'est pas suffisante pour induire une overcentration dans une souche *C. elegans* dans laquelle Ce-GPR-1/2 est encore présente. Nous avons émis l'hypothèse d'une compétition pour les sites générateurs de forces entre les deux protéines. Dans le premier cas il pourrait y avoir une compétition entre les protéines GPR transgéniques et endogènes au niveau du complexe responsable de la traction des microtubules. Ainsi en présence de la protéine endogène, Cbr-GPR-2 ne serait pas assez forte pour induire l'overcentration dans un fond génétique *C. elegans*. Cependant ceci est en contradiction avec le fait que nous observons du NCC rocking en prophase

reflétant de fortes forces de traction à l'antérieur. Une hypothèse serait que les deux protéines n'aient pas la même stabilité au niveau des sites de tractions des microtubules. Par exemple, le recyclage de la protéine endogène et du transgène pourrait être différent. Ainsi il y aurait assez de Cbr-GPR-2 pour faire du NCC rocking mais pas assez de sites occupés par cette protéine pour parvenir à une overcentration finale. En revanche une seconde hypothèse pourrait être que l'action combinée de Cbr-GPR-2 et Ce-GPR-1/2 génère le NCC rocking alors que seule Cbr-GPR-2 peut induire l'overcentration à partir d'un certain nombre de générateurs de force activés. De la même manière qu'il y a un seuil pour l'initiation des oscillations, il pourrait y avoir un seuil pour l'overcentration. Enfin les premiers résultats obtenus sur l'étude des protéines chimères suggèrent que le domaine responsable de l'overcentration pourrait se situer dans la partie Cter de la protéine Cbr-GPR-2. Ceci n'a cependant pas pu être confirmé car la souche complémentaire (contenant la chimère *Nter-Ce/Cter-Cb-gpr*) n'a pas pu être produite.

Pour la lignée *Cb + Cegpr*, il est probable que la centration du NCC se fasse par un mécanisme passif plutôt que par la participation active de Ce-GPR-1. En effet dans *C. elegans*, la déplétion de *Ce-gpr-1/2* n'inhibe pas la centration, elle la ralentit uniquement. Le positionnement est alors accompli de manière passive grâce à la force de centrage exercée par les microtubules en croissance contre le cortex cellulaire. Ainsi, que le transgène ne soit pas fonctionnel ou qu'il ait un effet dominant négatif il en résulterait dans tous les cas une centration. Il ne nous ait donc pas possible de conclure sur le rôle dominant négatif ou non de *Ce-gpr-2* dans la centration du NCC chez *C. briggsae*.

III.C. Conclusion

Ce projet avait comme ambition de décrypter les zones régulatrices de la protéine GPR en exploitant les différences de phénotypes de positionnement du NCC et du fuseau entre *C. elegans* et *C. briggsae*. Nous avons cependant rencontré des écueils pour la mise en place des lignées transgéniques, notamment dus aux problèmes de silencing dans la lignée germinale (voir Chapitre 3). Nous avons aussi été confrontés à un problème pourtant simple de biologie moléculaire, mais découvert trop tard pour le contourner.

Chapitre 3: Projets en perspective et données préliminaires

I. Étude de la dynamique de GPR

I.A. Optogénétique

Même si l'expression de GPR est cruciale pour la génération des forces de traction, les études faites sur GPR montrent surtout des corrélations entre l'enrichissement de la protéine et les mouvements du fuseau ou des noyaux. Par exemple, nous avons corrélié l'enrichissement au cortex antérieur de Cbr-GPR-2 avec l'overcentration des pronoyaux chez *C. briggsae*. De même, le déplacement du fuseau corrèle avec l'enrichissement postérieur de GPR en début d'anaphase. Dans le but de mieux comprendre le mode de fonctionnement de la protéine GPR nous souhaiterions déplacer ou recruter la protéine à une position spécifique du cortex et ce n'importe quand pendant la mitose, et observer les conséquences sur les mouvements du fuseau ou du NCC. Par exemple si on force le recrutement de GPR en prophase à l'antérieur est ce que cela conduit forcément à une overcentration des pronoyaux ? Ou si on force le recrutement de la protéine au cortex postérieur en prophase est ce que les noyaux peuvent quand même atteindre le centre de la cellule ? De même en anaphase cela nous permettrait d'observer les conséquences de la localisation de GPR sur les mouvements du fuseau. Ainsi on pourrait discriminer si les mouvements du fuseau ainsi que la force de ces mouvements sont dépendants du cycle cellulaire ou de certains domaines de GPR. Cela nous permettrait également de mieux comprendre le mécanisme du « switch positionnel ». Pour cela nous devons être capables de contrôler la localisation de la protéine dans le temps et dans l'espace. Nous avons besoin également d'un système très rapide de relocalisation des protéines car l'anaphase ne dure pas plus de deux minutes dans les embryons de *C. elegans*.

Un système optogénétique rapide répondrait à tous ces critères. Nous cherchons à exploiter le système CRY2/CIBN dans le nématode. Cryptochrome 2 (CRY2) et le facteur de transcription CIBN sont deux protéines issues de la plante qui peuvent dimériser après une induction à l'UV. Grâce à un motif CAAX ou une myristoylation, CIBN est ancrée à la membrane. Une protéine d'intérêt est fusionnée à CRY2. Après photoactivation, du fait de la dimérisation CRY2/CIBN, la protéine d'intérêt est recrutée à la membrane à l'endroit spécifique de l'induction et ce en quelques secondes (Kennedy et al., 2010). En fusionnant GPR à CRY2, nous pourrions forcer le recrutement rapide et très local de GPR au cortex, et ce

à n'importe quel stade du cycle cellulaire. Cette technique a déjà été utilisée avec LGN (homologue de GPR) dans des cellules de mammifère par l'équipe de Matthieu Coppey (Institut Curie, Paris). Mais suite à la diffusion membranaire, la protéine se retrouve très rapidement localisée tout autour du cortex. Ainsi on ne peut pas tester les effets de la localisation de LGN sur les mouvements du fuseau. Nous avons donc voulu tester cette technique dans l'embryon de *C. elegans* en collaboration avec l'équipe de M. Coppey, car la cellule étant plus grande, il est possible que le phénomène de diffusion soit moins marqué. Ainsi en ne ciblant qu'une petite région du cortex la protéine pourra être restreinte à cette région malgré la diffusion. J'ai donc essayé de créer une lignée exprimant CRY2::mcherry et CIBN::GFP (CIBN étant fusionné en plus à un motif CAAX pour l'ancrer au cortex). Le gène *cry2* a été cloné avec la mcherry en Cter et sous contrôle du promoteur *Ce-pie-1*. J'ai ensuite tenté de cloner la GFP, CIBN et le motif CAAX par PCR fusion mais sans succès. Le construit CIBN-CAAX a finalement été synthétisé par Genscript. La séquence a été par la même occasion codon-optimisé pour l'expression dans *C. elegans*. Ce construit a été fusionné à la GFP en Nter et sous contrôle du promoteur *Ce-pie-1* (voir Matériel et Méthode).

J'ai essayé plusieurs techniques de transgénèse (microinjection, bombardement) mais quelle que soit la technique employée je ne suis jamais parvenue à créer une lignée exprimant les protéines d'intérêt (Tableau 8 et Tableau 9). Pourtant, des PCR sur vers montrent bien la présence du transgène dans le génome de ces vers. Chez *C. elegans* on sait déjà qu'il est plus difficile d'exprimer un transgène dans la lignée germinale que dans les cellules somatiques car il y a un mécanisme qui protège l'intégrité du génome que l'on appelle le « silencing » comme évoqué dans la partie II.A.7.

À cause de ce mécanisme, il est parfois compliqué d'exprimer des gènes endogènes fusionnés à la GFP et encore plus difficile d'exprimer des transgènes entièrement exogènes. De plus, CRY2 semble montrer des effets toxiques chez la drosophile (Matthieu Coppey, communication personnelle) ce qui, si cela se vérifie chez *C. elegans*, ne facilitera pas la transgénèse. Souvent, on s'appuie sur le fait que l'on transforme un grand nombre de vers pour générer une lignée positive. Mais dans le cas de CRY2 et de CIBN cela n'est pas suffisant. Il serait plus efficace de trouver un moyen d'inactiver le silencing. J'ai donc par la suite cherché des stratégies pour réduire ce silencing.

Tableau 8 : Microinjection réalisées pour obtenir des lignées exprimant CRY2 ou CIBN.

Espèce	Technique	Promoteur	Insert	Nb de vers microinjectés
<i>C. elegans</i>	MosSCI	<i>Ce-pie-1</i>	<i>Cry2 ::mcherry</i>	40
<i>C. elegans</i>	MiniMos	<i>Ce-spd-1</i>	<i>Cry2 ::mcherry</i>	25
<i>C. elegans</i>	MiniMos	<i>Ce-spd-1</i>	<i>Cry2 ::mcherry</i>	25
<i>C. elegans</i>	MiniMos	<i>Ce-pie-1</i>	<i>Myr-cibn ::gfp</i>	15
<i>C. elegans</i>	MiniMos	<i>Ce-spd-1</i>	<i>Myr-cibn ::gfp</i>	9
<i>C. elegans</i>	MiniMos	<i>Ce-pie-1</i>	<i>Gfp ::cibn-caax</i>	42
<i>C. elegans</i>	MiniMos	<i>Ce-spd-1</i>	<i>Gfp ::cibn-caax</i>	27

Tableau 9 : Bombardements réalisés pour obtenir des lignées exprimant CRY2 ou CIBN.

Espèce	Promoteur	Insert	Nb de lignées potentielles
<i>C. elegans</i>	<i>Ce-pie-1</i>	<i>Cry2 ::mcherry</i>	21
<i>C. briggsae</i>	<i>Ce-pie-1</i>	<i>Cry2 ::mcherry</i>	3
<i>C. elegans</i>	<i>Ce-pie-1</i>	<i>Gfp ::cibn-caax</i>	4

I.B. Silencing

Le mécanisme du silencing commence à être décrypté depuis quelques années. En 2012 l'équipe de Craig Mello a mis en évidence deux protéines argonautes impliquées dans ce mécanisme. Ces protéines prennent en charge de petits ARN d'une vingtaine de nucléotides avec lesquels elles vont scanner le génome à la recherche des séquences complémentaires. Ces protéines argonautes sont CSR-1 et PRG-1. CSR-1 est responsable de la détection et de la protection des gènes du soi alors que PRG-1 est responsable de l'initiation du silencing contre les gènes du non-soi (Seth et al., 2013; Shirayama et al., 2012). Lorsqu'une lignée est silencée, le simple fait d'inactiver *prg-1* n'est pas suffisant. En effet PRG-1 est important pour l'initiation du mécanisme mais il est secondaire dans la boucle d'amplification qui maintient l'inactivation. En revanche créer une lignée à partir d'une lignée mutée pour *prg-1* semble fonctionner. En effet, un transgène, conduisant à 100% de silencing sur 43 lignées, microinjecté dans un mutant *prg-1* donne 100% d'expression sur 5 lignées (Shirayama et al., 2012). Nous voulions microinjecter des vers dans lesquels *prg-1* a

été inactivé par RNAi puis testé, dans le cas où des lignées auraient été positives, si après l'arrêt du RNAi l'expression des transgènes était maintenue ou si au contraire au cours des générations le silencing finissait quand même à se mettre en place. Cette expérience n'a pas abouti suite à des problèmes techniques et nécessite d'être recommencée.

Une autre idée serait de croisée une lignée silencée pour un transgène exprimant par exemple la GFP avec une lignée positive pour la GFP. La lignée positive doit posséder de petits ARN ciblés contre *gfp* et pris en charge par CSR-1. J'ai tenté cette stratégie en croisant mes lignées avec une lignée GFP::H2B, mais ceci n'a pas été suffisant pour lever le silencing.

En revanche, Shirayama *et al.*, ont montré en 2012 que certaines lignées GFP sont dites « activatrices » et sont en quelque sorte résistantes aux silencing. Notamment, elles permettent de lever le silencing dans des lignées silencées. Comment ces lignées ont-elles été identifiées ? Le RNAi est un phénomène transitoire. Ainsi, lorsqu'un gène est ciblé par RNAi, son expression reprend dès l'arrêt du traitement RNAi. Les auteurs ont montré que dans certaines lignées transgéniques exprimant un gène en copie unique associé à la GFP, après un traitement RNAi contre la GFP puis arrêt du RNAi, il n'y avait pas de retour du signal GFP dans les animaux traités, ni même dans les générations suivantes. Ceci indique qu'un silencing peu se mettre en place secondairement. Par contre dans certaines lignées transgéniques possédant plusieurs copies d'un transgène GFP, ils observent un retour du signal dès la F1 ou la F2. Ce sont ces lignées qu'ils vont considérer comme étant résistantes au silencing. Les auteurs montrent ensuite qu'en croisant ces lignées préalablement testées pour être activatrices (résistantes), le silencing peut être levé dans des lignées auparavant incapables d'exprimer un transgène.

J'ai donc essayé cette technique et j'ai cherché les lignées qui pouvaient être activatrices dans notre collection de souches transgéniques exprimant la GFP. J'ai choisi quatre lignées qui ont été créées par bombardement. Sur les quatre lignées j'ai pu observer un retour de la fluorescence dès la génération F1 (Figure 48).

Souche AZ212 (his::GFP)

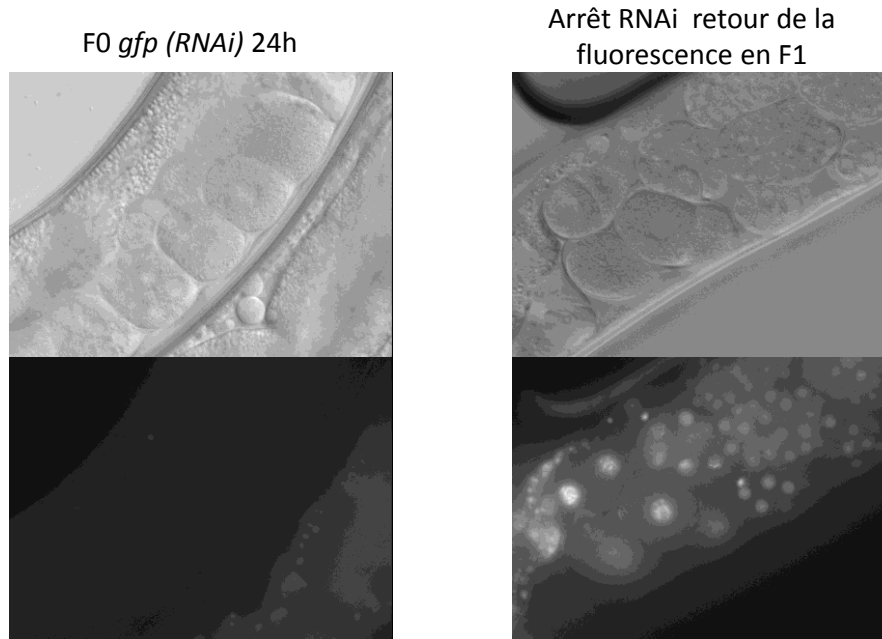


Figure 48: Identification d'une lignée "activatrice"

Un RNAi de 24H contre la *gfp* d'une lignée his ::GFP provoque l'arrêt de l'expression du transgène et donc l'arrêt du signal de fluorescence. Après arrêt du RNAi, on peut observer un retour du signal histone ::GFP dès la F1 indiquant que le silencing ne s'est pas mis en place.

J'ai gardé une lignée exprimant l'histone fusionnée à la GFP, *his ::gfp* pour réaliser les croisements. Je n'ai cependant pas réussi à activer l'expression du transgène silencé dans les lignées croisées. J'ai cependant constaté que l'expression du signal GFP de l'histone s'est maintenue, ce qui est plutôt encourageant.

Je n'ai pas eu le temps d'aller plus loin dans ces essais de « desilencing » mais c'est un problème qu'il sera important de résoudre dans l'avenir car cela nous a beaucoup freiné pour mes différents projets. C'est un problème par ailleurs général pour l'équipe qui étudie l'embryon précoce de différentes espèces de nématodes pour lesquelles le silencing est a priori très prononcé.

Chapitre 4 : Automatisation du tracking des pôles du fuseau mitotique à partir de films en DIC

Lors de mes travaux, j'ai eu recours à la même méthode pour l'analyse des différents phénotypes observés dans les différentes espèces ou dans les différents contextes mutants. J'ai suivi le déplacement des centrosomes le long de l'axe antéro-postérieur et le long de l'axe transverse durant toute la division. Afin de faciliter cette analyse, réalisée dans de nombreux embryons, nous avons initialement envisagé de travailler avec des lignées transgéniques fluorescentes de *C. briggsae* et de *C. elegans*. Ces lignées exprimaient une protéine histone et la γ -tubuline toutes deux couplées à la GFP afin de suivre facilement les centrosomes et parallèlement l'évolution de la mitose. La détection de ces signaux de fluorescence est facilement automatisable. Cependant il s'est avéré que dans la lignée de *C. briggsae* exprimant ces transgènes, les oscillations du fuseau étaient nettement réduites par rapport à la souche sauvage de *C. briggsae*. Nous avons donc fait le choix de ne pas utiliser ce fond génétique, afin d'être sûr de ne pas altérer les processus que nous voulions observer. Les souches ont ainsi été observées et filmées en optique DIC. Alors que les centrosomes, les noyaux et le fuseau sont facilement détectables à l'œil en optique DIC, la détection automatisée par l'ordinateur est beaucoup plus complexe. J'ai donc effectué tous les tracking manuellement grâce à un plugin d'Image J (voir Matériel et Méthode). Cependant ces analyses ont pris plusieurs jours voire semaines. Sachant qu'un des projets de l'équipe était de comparer la première division d'embryons dans une quarantaine d'espèces, il était indispensable de mettre au point un outil qui facilite l'analyse des films en DIC.

Nous avons alors collaboré avec l'équipe de Martin SPICHTY (LBMC, Lyon) afin de mettre au point un programme de tracking automatique des centrosomes d'embryon filmé en optique DIC. Ce programme qui fonctionne sous ImageJ permet d'analyser des films à plus grande échelle. Un embryon peut être analysé en 1 ou 2 minutes contre 10 à 15 minutes manuellement. L'article de méthode présentant ce programme est présenté dans ce chapitre.



Automated High-Throughput Quantification of Mitotic Spindle Positioning from DIC Movies of *Caenorhabditis* Embryos

David Cluet, Pierre-Nicolas Stébé[‡], Soizic Riche[‡], Martin Spichly*, Marie Delattre*

Laboratory of Molecular Biology of the Cell, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Centre National de la Recherche Scientifique, Lyon, France

Abstract

The mitotic spindle is a microtubule-based structure that elongates to accurately segregate chromosomes during anaphase. Its position within the cell also dictates the future cell cleavage plan, thereby determining daughter cell orientation within a tissue or cell fate adoption for polarized cells. Therefore, the mitotic spindle ensures at the same time proper cell division and developmental precision. Consequently, spindle dynamics is the matter of intensive research. Among the different cellular models that have been explored, the one-cell stage *C. elegans* embryo has been an essential and powerful system to dissect the molecular and biophysical basis of spindle elongation and positioning. Indeed, in this large and transparent cell, spindle poles (or centrosomes) can be easily detected from simple DIC microscopy by human eyes. To perform quantitative and high-throughput analysis of spindle motion, we developed a computer program ACT for Automated-Centrosome-Tracking from DIC movies of *C. elegans* embryos. We therefore offer an alternative to the image acquisition and processing of transgenic lines expressing fluorescent spindle markers. Consequently, experiments on large sets of cells can be performed with a simple setup using inexpensive microscopes. Moreover, analysis of any mutant or wild-type backgrounds is accessible because laborious rounds of crosses with transgenic lines become unnecessary. Last, our program allows spindle detection in other nematode species, offering the same quality of DIC images but for which techniques of transgenesis are not accessible. Thus, our program also opens the way towards a quantitative evolutionary approach of spindle dynamics. Overall, our computer program is a unique macro for the image- and movie-processing platform ImageJ. It is user-friendly and freely available under an open-source licence. ACT allows batch-wise analysis of large sets of mitosis events. Within 2 minutes, a single movie is processed and the accuracy of the automated tracking matches the precision of the human eye.

Citation: Cluet D, Stébé P-N, Riche S, Spichly M, Delattre M (2014) Automated High-Throughput Quantification of Mitotic Spindle Positioning from DIC Movies of *Caenorhabditis* Embryos. PLoS ONE 9(4): e93718. doi:10.1371/journal.pone.0093718

Editor: Christian Braendle, Centre National de la Recherche Scientifique & University of Nice Sophia-Antipolis, France

Received: January 20, 2014; **Accepted:** March 5, 2014; **Published:** April 24, 2014

Copyright: © 2014 Delattre et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This project has been funded by grants from the CNRS (ATIP) to M.D. and from the Grand Equipement National de Calcul Intensif (GENCI, x2013076381) to M.S.; S.R. and P-N.S. are supported by a PhD fellowship from the Region Rhône-Alpes. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: marie.delattre@ens-lyon.fr (MD); martin.spichly@ens-lyon.fr (MS)

[‡] These authors contributed equally to this work.

Introduction

The *C. elegans* one-cell embryo is a large and transparent cell, very easy to manipulate and to observe under a DIC microscope. Over the past 20 years, these features combined with the power of the worm genetic, have served to decipher a large variety of essential cellular processes [1,2]. Among those, the mechanisms controlling spindle positioning have been extensively studied both at the molecular and biophysical levels. Important discoveries were made on highly conserved molecules and mechanisms, applicable to all cells undergoing oriented cell division, including mammalian cells [3,4].

The cytoplasm of worm embryos is filled with refringent yolk granules. As a consequence, every structure that is devoid of these granules is well visible on DIC images. Therefore, size, shape and position of the nuclei, the mitotic spindle and the spindle poles (i.e. centrosomes) can be easily detected manually (Figure 1 and Videos S1 & S2). In the one-cell *C. elegans* embryo, the mitotic spindle forms in the center of the cell and is then asymmetrically pulled

towards the posterior pole of the cell. In doing so, it undergoes vigorous transverse oscillations, which reflects the mechanisms of action of force generators at the cortex [5–7]. The quantitative analysis of spindle displacement and oscillations in *C. elegans* embryo is therefore crucial to dissect mutant phenotypes and further unravel the physical mechanisms of spindle positioning. Analysis of spindle motion is achieved by measuring the position of each centrosome during mitosis.

Despite its short cell cycle, manual tracking of centrosomes and nuclei positions from DIC images of *C. elegans* embryos is time consuming. Therefore, the automated tracking of such objects became rapidly needed for quantitative analysis of nuclei and spindle movements. From DIC images, it has been possible to automatically track the position of nuclei, which are nicely delineated by the nuclear envelope [8]. In contrast, automated tracking of the spindle have been only developed from images of transgenic lines expressing fluorescent markers of centrosomes. These images offer an excellent signal-over-noise ratio, which facilitates automated image processing [6,9]. Nevertheless, such

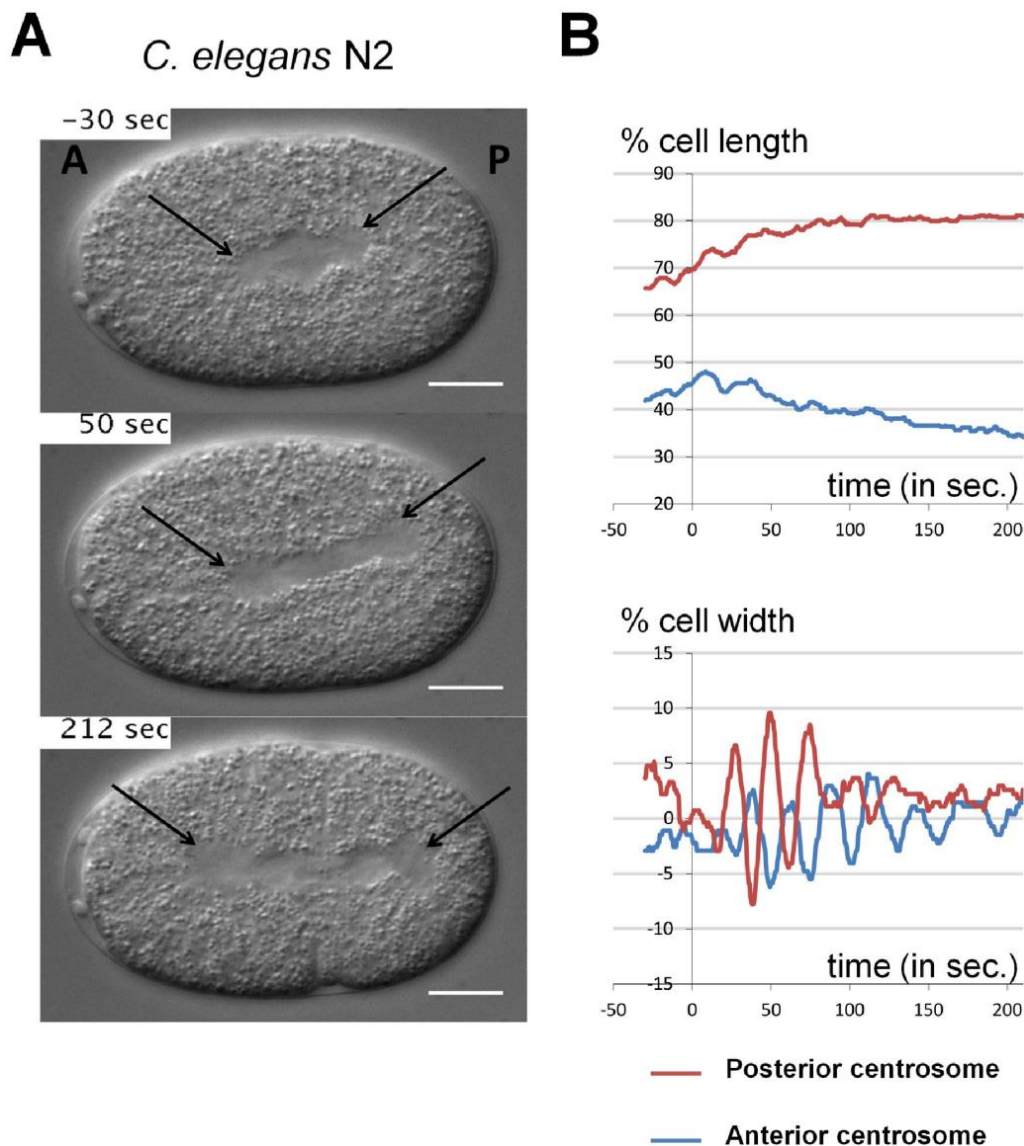


Figure 1. Centrosome displacements from manual tracking. **A.** Snapshots from DIC recording of *C. elegans* N2 wild-type one-cell stage embryo. Anterior is to the left and posterior to the right. Centrosomes are shown with black arrows. Scale bar is 10 μ m. **B.** Manual tracking of centrosomes displacement on the transverse (upper panel) and antero-posterior (lower panel) axes over time relative to anaphase onset ($t=0$ sec defined as the initial separation of chromosomes observed by DIC microscopy), for the embryos showed in A. The positions of the posterior and anterior centrosomes are represented by the red and the blue curves, respectively. For the antero-posterior displacement 0% corresponds to the anterior pole, 100% to the posterior pole of the cell. For the transverse displacement 0% is the center of the cell, 50% the upper side of the cell and -50% is the lower part of the cell.

doi:10.1371/journal.pone.0093718.g001

analyses require establishing transgenic lines and rely on sophisticated fluorescent microscopes. Importantly, genetic analysis is then very laborious because rounds of crosses are needed to combine mutations with fluorescent reporters. Moreover, such techniques are not applicable to other worm species for which transgenesis is not accessible [10]. Last, fluorescent reporters can cause subtle phenotypic changes, introducing biases in quantitative analysis.

We therefore developed a computer program that detects centrosome position over time from DIC images. It analyzes spindle positioning quantitatively in various worm strains without requiring genetic manipulations. The computer program is a unique macro for the image- and movie-processing platform ImageJ. Within 2 minutes, movies are processed and the

trajectories of the centrosomes are detected with high accuracy. The program generates a movie showing the position of centrosomes over time on the input DIC movie, which allows a visual check of the tracking quality. The program generates time-series graphs of the centrosome positions as well as a text file containing the position of each centrosome over time. Last, the program allows batch-wise analysis of large series of movies.

Results

Design of the ACT macro

Our macro ACT (Automated Centrosome Tracking) has been designed to help experimentalists to automatically track centrosome position during *C. elegans* mitosis, from DIC movies (Figure 1).

The macro allows batch-wise movie analysis, i.e., sequentially automated tracking of multiple movies. To make the analysis most convenient for the user, the macro is divided in two parts (Figure S1): 1) A graphical user interface (GUI) loads the movies of interest and guides through the declaration of input settings that are required for the subsequent tracking process. 2) The macro launches the tracking process, movie by movie, with the specified input settings. This second part does not need any interaction with the user. Thus, the computer-time intensive tracking can be executed conveniently, at the user's discretion, in the background, over-night or on a computer cluster.

For the first part, we briefly summarize the required interactions between the user and the macro (see also Tutorial Movie S1). The GUI prompts the user to specify the path of the folder that contains all movies to be processed. Importantly, embryos must be oriented prior to the analysis, so that their anterior pole is to the left and the longest axis of the cell is horizontal. Then the GUI sequentially displays the movies and, for each of them, the user indicates the embryo size and the portion of the movie to be analyzed (starting and ending frame). Finally, the user marks the position of the centrosomes on the initial and last frame of the movie. When all movies are pre-processed, the user is prompted to launch the actual tracking.

In DIC movies, centrosomes are displayed as smooth circular regions with a low variance of pixel values; in contrast to their environment (the cytoplasm) that is characterized by a distinct granularity of high pixel variance. The tracking capability of the macro relies on this difference of pixel variance. To detect the position of the centrosome in a given frame of the movie, the macro's tracking engine executes five steps (Figure 2). In the first step, the position of the centrosome in the previous frame is projected on the current frame. The initial position is the one indicated by the user. Next, the tracking engine searches for a circular region of minimal mean variance in the vicinity of the projected position. To this end, rectangular boundaries are defined (Table S2) that limit the search around the projected centrosome position (the boundary box). The center of a circle is then moved within the boundary box to scan for the position of minimal mean variance (of pixel values within the circle area). When the minimum is found, the center of the scanning circle marks the new position of the centrosome in the current frame.

The ACT macro logs the tracked positions of the centrosomes for each frame into a report file (as well as additional information on the movie and input settings). It also generates a processed movie that displays an overlay of the DIC images and the detected location of both centrosomes over time (for examples, see Videos S3, S4, S5, S6, S7, S8). This movie permits rapid evaluation of the quality of the tracked trajectories. The overall tracking and reporting process requires 1–2 minutes depending on the movie length and its resolution.

Tracking variability between human manipulators

For a critical evaluation of the macro, it was essential to know the precision of the standard procedure for manual tracking. Thus far, we performed manual centrosome tracking using the “Manual Tracking” plugin of the program ImageJ. As a control experiment, we determined the variability between different human manipulators using this plugin. Two manipulators tracked the trajectories of the anterior and posterior centrosomes for a heterogeneous collection of 18 mitosis events (Table S1). To evaluate the similarity between the detected trajectories, we measured the distribution of the root-mean-square deviation (RMSD) values for the anterior and posterior trajectories (Figure 3). RMSD is a measure for the overall deviation between two series of points (see

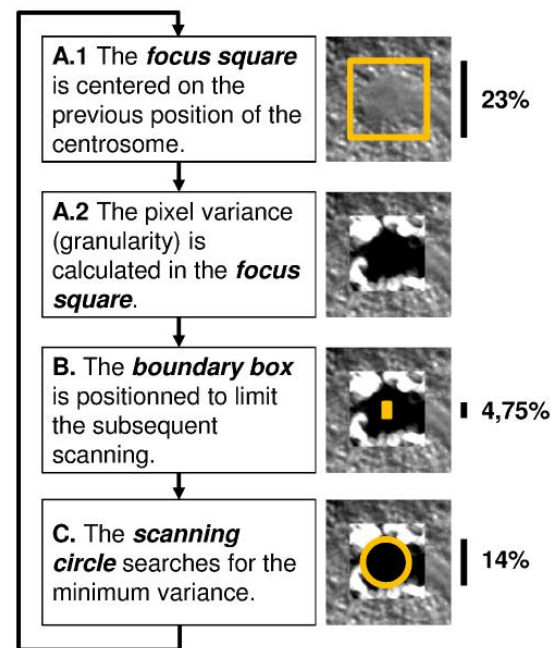


Figure 2. Tracking engine of the ACT macro. **A.** The position of the centrosome in the previous frame is projected on the current frame. A square window is drawn around the projected position, and the granularity (i.e., pixel-value variance within a circle of about 1% of the embryo height) is determined within this window. The macro defines the size of this focus square to be large enough for the subsequent scanning of a circular region with minimal granularity. **B.** To make this scanning process efficient (and also to avoid too strong movements of the centrosomes from one frame to another), a smaller rectangular box is defined that limits the search within the boundaries of the box. We refer to this box as the boundary box. The height (h_{bb}) is about 4% of the height of the embryo. (The width of the boundary box is half of its height.) The boundary box is centered vertically on the previous centrosome position. Horizontally it is shifted either towards the anterior or posterior side of the embryo to take into account the natural dynamic behavior of centrosomes; see Table S2 for more details. **C.** The actual search is done by positioning the center of a circle (which diameter, d_{sc} , is about 14% of the height of the embryo) successively to all pixels inside the boundary box. At each pixel, the mean granularity within the scanning circle is determined. The pixel for which the circle surface area shows the minimal mean granularity marks the new center of the centrosome. This position is projected to the next frame, and the tracking engine continues with step A). doi:10.1371/journal.pone.0093718.g002

Methods). We found that the manipulators track the centrosomes trajectories with a RMSD of $0.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (i.e. 2% of the embryo height).

Optimization of the ACT macro

In its current version, the tracking engine of the macro can be regulated by two geometric parameters: the height of the boundary box and the diameter of the scanning circle (Figure 2). In addition, we introduced a parameter to control the direction of the analysis, i.e., a logical switch that permits the tracking either in forward direction (starting from the first frame), or in backward direction (starting from the last frame).

To determine reliable settings for these parameters, we applied a classical optimization procedure, i.e., we fitted the parameter values to obtain the highest conformance with manual tracking. As a starting point for the optimization, we arbitrarily set the height of the boundary box and the diameter of the scanning circle to 1 (corresponding to 4% and 12% of the embryo height, respective-

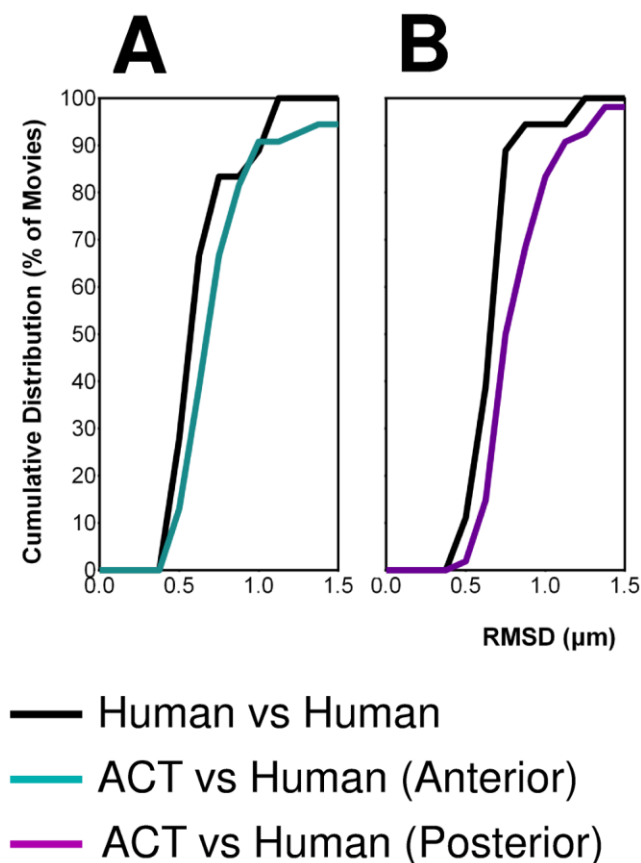


Figure 3. Accuracy of centrosome tracking. Normalized cumulative distributions of RMSD values for the tracked trajectories of the anterior centrosome in **A**. and posterior centrosome in **B**. The curves “Human vs Human” and “ACT vs Human” are composed of 16 and 54 movies, respectively (Table S1). The curves were constructed with a bin size of 0.1 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0093718.g003

ly). We considered more than 160 different combinations of parameter values, by varying the relative size of the geometric parameters from 0.5 to 1.75, and by performing the analysis in forward and backward direction. We trained and tested the parameters on an extended heterogeneous set of 54 mitosis movies where the coordinates of manually tracked trajectories for the anterior and posterior centrosomes were available (including the 18 movies that were tracked by two humans). The set consisted of movies from wild-type, transgenic, mutant and RNAi treated embryos for both *C. elegans* and *C. briggsae* species, as well as wild-type strains of *C. species* 10, spanning a large variety of spindle trajectories (Table S1). We picked the optimal set of parameters through hold-out validation; the RMSD with respect to manual tracking served as scoring function (see Methods). A separate optimization was performed for the anterior and posterior centrosomes because they generally display different visual and dynamic behaviors.

Importantly, we found that the tracking of the anterior centrosome was clearly more efficient in forward direction, whereas the posterior centrosome was significantly better tracked in backward direction. We speculate that this is due to dynamic changes of the granularity within the embryo during mitosis. Among the geometric parameters, the boundary box seems more sensitive than the diameter of the scanning circle. The optimal relative height of the boundary box is 1.125 and 1.375 for the

anterior and posterior centrosome, respectively. The best relative values for the diameter of the scanning circle are 1.250 and 1.125. The optimal parameter values are preset as default in the current version of the macro, but can be modified by users in the GUI.

Overall, the analysis of the 54 movies by the macro produced 6 outliers. Such outliers have an RMSD of more than 3 μm with respect to the human manipulator, and their tracked trajectories were clearly erroneous as centrosomes were detected within the nuclei (Videos S9 & S10). Causes for erroneous analyzes are given in the section “Restrictions & Recommendations”.

The cumulative distribution of RMSD values (Figure 4) reveals that, apart from the outliers, the tracking accuracy of the macro matches the accuracy of the human manipulators. The mean RMSD value of “Computer vs Human” (without outliers) is shifted to higher RMSD with respect to “Human vs Human” by only 0.05 μm and 0.20 μm for the anterior and posterior centrosome, respectively. This is less than 0.6% of the embryo height, and within the error bars of the manual tracking. Overall, while a small fraction of movies (6/54) yielded totally erroneous centrosome paths, all other movies were processed with high accuracy using our macro and optimized parameters.

Robustness of the tracking program

With the macro provided here, the user has to pick (using mouse click) the position of the centrosome centers at the beginning and at the end of the mitosis event. To investigate how the choice of the centrosome coordinates influences the tracking, we tested a large variation of different starting/ending coordinates for a given movie. We found that even with an extreme deviation of more than 1 μm at the beginning, the forward analysis of the anterior catches up quickly (within 10–20 frames) the reference tracking (i.e., the tracking with no deviation, see Figure S2). The same is true for the backward tracking of the posterior when starting with a large deviation in the last frame. Thus, the picking of the centrosome coordinates is not very crucial for the overall tracking performance. However, an extremely bad picking of the initial centrosome position may delay the convergence to the correct trajectory, reducing the exploitable portion of the tracking.

As a final test, we analyzed an extra set of 84 movies with the ACT macro (for which no manual tracking was available). The quality of the tracking was judged by visual inspection of the output movies. Out of 84 movies, 76 movies were tracked correctly and 8 gave a clear failure. The failure rate of 10% is therefore consistent with the one obtained on the 54 movies during the optimization tests.

Discussion

We present a new and unique automated program to detect mitotic spindle positioning for high throughput projects and analyze phenotypes in a quantitative manner, from simple DIC images. With this system, data acquisition and analysis is inexpensive and fast. The time saved over manual analysis is about 10 min per movie. The program is freely available upon request. With our optimized combination of parameters, our program performs tracking accuracy comparable to the human eye for 90% of the movies analyzed.

Restrictions & Recommendations

The macro failed to track one (or both) centrosome(s) in about 10% of the analyzed movies. We identified three reasons for this:

- 1) Our tracking engine is based on the identification of granularity boundaries between the centrosomes and its

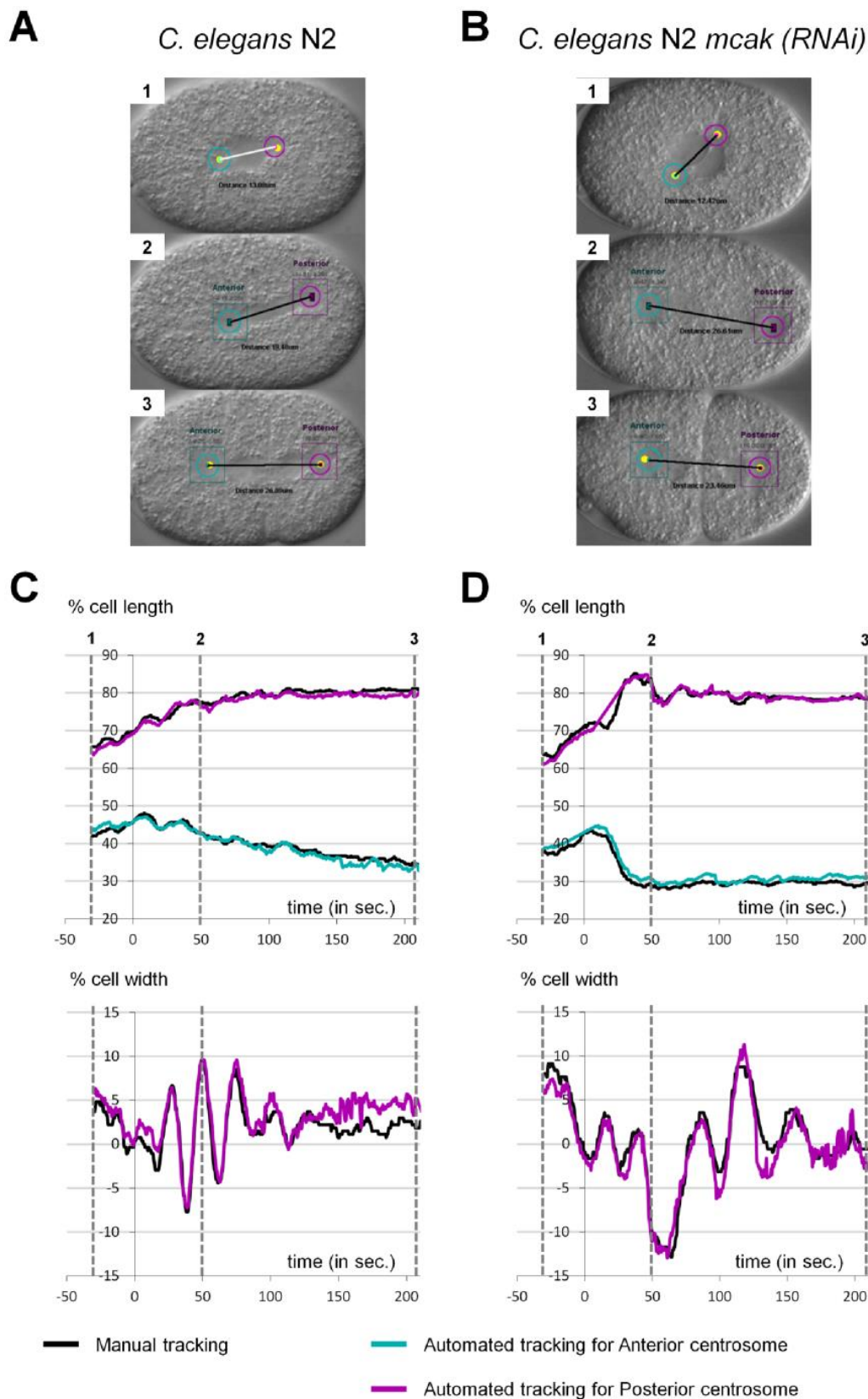


Figure 4. Examples of comparison between Human and ACT. A–B: Snapshots from output movies generated by ACT. (A) *C. elegans* N2 wild type, (B) *C. elegans* N2 *mcak-1(RNAi)* early embryos. Anterior is to the left and posterior on to right. C–D: Superposition of manual (black curve) and automated (cyan and magenta curves) tracking of centrosome displacements on the antero-posterior (upper panel) and transverse (lower panel) axes for the embryos presented in A and B over time relative to anaphase onset ($t=0$ sec defined as the initial separation of chromosomes observed by DIC microscopy). The time corresponding to each snapshot is indicated on the graphs. For the antero-posterior displacement 0% corresponds to the

anterior pole, 100% to the posterior pole of the cell. For the transverse displacement 0% is the center of the cell, 50% the upper side of the cell and –50% is the lower part of the cell.

doi:10.1371/journal.pone.0093718.g004

environment (cytoplasm, spindle). Consequently, movies cannot be tracked for the earliest steps of mitosis, i.e., when centrosomes are not expanded yet and there is no difference in granularity with respect to the spindle. At a late stage of mitosis, the posterior centrosome changes its shape and flattens. During this time period tracking of the posterior centrosome may yield to large fluctuations. Thus, the definition of the starting and ending frame is critical for the efficiency of the tracking. Our macro is therefore best suited to follow spindle trajectories from metaphase to telophase. The user should note that even if the tracking fails at the very beginning (for the posterior centrosome) or at the very end (for the anterior centrosome) of the movie, the remaining and largest fraction of the movie analysis may be still exploitable (for an example, see Videos S11 & S12).

- 2) The disappearance of a centrosome from the focal plan for more than 5 frames is prejudicial for the automated tracking and gives rise to an aberrant trajectory. It is therefore essential to provide constant focus during the movie. Nevertheless, it is sometimes impossible to have both centrosomes in the same focal plane, especially during the oscillation phase. Consequently, there is an increasing risk of failure to track both centrosomes in *C. elegans* mutants or other nematode species for which spindle oscillations are very pronounced.
- 3) Finally, the quality of the tracking is increased when movies are acquired with a strong contrast, i.e., the recorded raw DIC images should span the entire spectrum of grey levels. As a consequence, the detection of changes in granularity is more robust. Adjusting the contrast through post-processing filters is an option that will be tested in a future version.

Overall, movies with defocus and contrast problems may be still analyzed with the macro but the failure rate should increase.

Importantly, our program is robust to different pixel resolution of input movies. Indeed, it automatically scales the size of the boundary box and scanning circle to accommodate custom values of pixel resolution; the user can specify the pixel resolution in the GUI. We have tested the program's robustness for pixel resolutions ranging from 0.0645 to 0.258 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Lower values of pixel resolution can be used but require more RAM (>4 GB) and CPU time. Higher values than 0.129 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ may lead to inaccuracies especially for the posterior centrosome. Thus, using pixel resolution from 0.0645 to 0.129 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ does not require any reoptimization of the parameters.

Regarding the time resolution of input movies, we applied successfully the macro to movies with a frequency of 2 frames/second (as we used for the optimization process) and 10 frames/second. Lower frequencies than 2 frames/second may, however, require an increase of the boundary box parameter, *hbb*. The boundary box needs to be sufficient large to follow the movement of the centrosome. Reducing the frequency of acquisition provokes abrupt displacements of the centrosome and therefore requires a larger box. We tested a value of 0.2 frames/second for which the optimal value of *hbb* needed to be multiplied by 3. The user should be aware however that an increased value of *hbb* consumes more CPU time.

Although designed to track centrosomes in the one-cell embryo of *C. elegans*, our program can be adapted to different cell types in the worm or outside worms. We offer the possibility to change the parameters of the tracking engine, allowing users to find out the

best parameters, for instance in cells where centrosomes are smaller.

Our computer program sets the stage for an accurate and objective quantification of spindle positioning from DIC movies, devoid of human variability. Its user-friendly design permits rapid high-throughput processing with tailored output generation for statistical analyses.

Materials and Methods

Strains and maintenance

Most strains and RNAi experiments were as described in [11]. N2 was used as the wild-type reference strain for *C. elegans* and JU1018 for *C. briggsae*. We used also two others wild-type *C. briggsae* strains: ED3036 (from China) and QR24 (from Canada). JU1333 is a wild type strains of *C. species 10* from India and JU1771 is an inbred line from JU1333 (a kind gift from MA Félix). *C. elegans gpr* mutants have been obtained from the *C. elegans* Genetic Center (CGC): VC1670 carries an homozygous deletion for *gpr-1* and RB1150 carries an homozygous deletion for *gpr-2*. Transgenic lines used are *C. briggsae* ANA037 (*unc-119(st20000)* III; *adeIs2[pMD078, Cepie-1::CeGPR-2::GFP]*; *mjIs42 [Cel-sid-2+Cel-myo-2::DsRed]*), *C. briggsae* ANA017 (*unc-119(st20000)* III; *adeIs3[pMD051, Cepie-1::CbGPR-2::GFP]*; *mjIs42 [Cel-sid-2+Cel-myo-2::DsRed]*), *C. elegans* ANA058 (*unc-119(ed3)* III; *oxIs279[pie-1::GFP::histone]* II; *ItIs25[pAZ132, pie-1::GFP::tba-2]*), *C. elegans* XA3501 (*unc-119(ed3)* *ruIs32 [pie-1::GFP::H2B+unc-119(+)]* III; *ojIs1[pie-1::GFP::tbb-2+unc-119(+)]*) from the CGC and *C. elegans* TH251 (*unc-119(ed3)* III; *ddIs33[yfp::gpr-1; unc-119(+)]*) (a kind gift from the Hyman lab). RNAi experiments were performed by feeding L3 and L4 larva for 24 to 48 h on transformed HT115 bacteria [1]. All the strains were cultured on NGM plates and fed with OP50 (*E. coli*) at 20°C, except transgenic strains that were maintained at 25°C. For one experiment JU1018 were grown at 28°C during 5 days and recorded at 28°C.

Time-lapse DIC video microscopy

Adults were dissected in M9 medium. Eggs were collected and mounted on 2% agarose pads, covered by a coverslip and recorded at 23°C—unless otherwise stated. DIC movies were acquired using an AxioImager A2 Zeiss (objective lens 100 \times , NA 1.4) equipped with a Kappa camera and its accompanying time-lapse module. The resolution was 0.129 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Images were taken every 0.5 seconds and TIFF files were converted in Quicktime movies with the ImageJ software.

Manual Tracking

Centrosome positions were tracked with the ImageJ software using the plugin “Manual Tracking”. Positions were determined every 0.5 seconds from the end of nuclei centration/rotation to the cytokinesis. Coordinates were saved in pixels.

Statistical analysis

The RMSD (in μm) of a centrosome trajectory with respect to a reference trajectory (e.g., manually tracked trajectory) was calculated by

$$\text{RMSD} = r \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [(x_i - x_{i,\text{ref}})^2 + (y_i - y_{i,\text{ref}})^2]}$$

with x_i, y_i the coordinates (in pixels) of the centrosome at frame number i , $x_{i,\text{ref}}, y_{i,\text{ref}}$ the coordinates of the reference analysis, N the total number of frames, and r the resolution of the movie in $\mu\text{m}/\text{pixel}$.

The standard deviation of the RMSD for a set of movies was calculated with

$$\sigma(\text{RMSD}) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (\text{RMSD}_j - \overline{\text{RMSD}})^2}$$

with RMSD_j the value of the j th movie, the $\overline{\text{RMSD}}$ mean value, and n the number of movies.

Tracking with the ACT macro

The use and installation of the ACT macro is explained in Tutorial Movies S1 and S2, respectively. As shown in Figure S1, ACT is composed of two parts. The first one is a graphical user interface guiding the scientist for movie pre-processing. It generates a command lines containing the parameters defined by the user. The second part performs the automated tracking using the previous command lines. For extensive details consult the user guide.

Optimization of the parameters of the tracking engine

The parameters of the macro are the height of the boundary box (hbb) and the diameter of the scanning circle (dsc). In addition we implemented a parameter that controls the direction of the analysis (forward or backward). As starting point for the optimization, we made an initial guess for hbb and dsc of 4% and 12% of the embryo height, respectively. In the current version of the macro, the values of these two geometric parameters are specified relative to those initially guessed parameters (which have been set arbitrarily to 1.0).

A common strategy for parameter fitting is hold-out validation. The available data (i.e., manually tracked movies) is split into a training set (typically 2/3 of the data) and a test set (1/3). The training set is used to pick the best values of the underlying parameters, the test set serves the purpose of validation of the fitted parameters on an independent data set. We composed equally heterogeneous training and test sets of 36 and 18 movies, respectively (see Table S1). The test set corresponds to the 18 movies that have been analyzed by two human manipulators.

We performed two separate parameter optimizations for the tracking of the anterior and posterior centrosome. To evaluate the performance of the ACT macro, we defined a scoring function,

$$SF = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \text{RMSD}_k^2}$$

with RMSD_k the root-mean-square deviation between the computer-detected and manually-tracked centrosome trajectory of the k^{th} movie, and n the total amount of movies of the training set ($n=36$). The goal was to minimize this scoring function by varying the values of the parameters.

We first performed a coarse-grained scan for the geometric parameters hbb and dsc where we tested all combinations of values

ranging from 0.5 to 1.5 (with a step size of 0.25). This scan was done for the analysis in forward and backward direction. It turned out, that directionality parameter is extremely sensitive to the type of centrosome (anterior or posterior). Figure S3 displays the scoring function surface in the parameter space of hbb and dsc for the forward and backward analysis. For the anterior centrosome, the scoring function surface of the forward analysis is clearly shifted to lower value than the backward analysis. For the posterior centrosome the opposite is true.

Based on these preliminary results we performed a second fine-grained scan of the parameters hbb and dsc with a step size of 0.125. For dsc , we increased the scan to 1.75 to fully encompass the minimal region. The anterior centrosome was analyzed only in forward direction and the posterior only in backward direction. Figure S4A shows the scoring function surface of this fine-grained scan. The global minimum is found at $hbb=1.125$, $dsc=1.250$ for the anterior and $hbb=1.375$, $dsc=1.125$ for the posterior centrosome. In general, the posterior analysis does depend less strongly on the geometric parameters.

In rare cases, the macro produced outliers where the tracking engine followed a wrong particle instead of the centrosome. These outliers are usually characterized by large RMSD values ($>2-3 \mu\text{m}$) and they dominate therefore the scoring function. Since these outliers can be easily identified and removed by the user, we found it pertinent that the fitted parameters are also optimal for cases where the non-optimal analyses have been removed. We therefore investigated how the scoring function changes upon removal of the largest RMSD values. Figure S4B displays the scoring function surface for skipping the four highest RMSD values (10%). For the anterior centrosome, a new local minimum appears; the global minimum is, however, still the same. For the posterior centrosome, removal of the highest RMSD values makes the analysis even more insensitive to the geometric parameters.

To visualize the optimization gain, Figure S5A shows the distribution of RMSD values of the training set for the initial and fitted parameter values. For both, the anterior and posterior centrosome, there is a clear shift of the distribution to lower RMSD value for the fitted parameters with respect to the initially guessed parameters.

To validate the trained parameters, we applied them to the 18 movies of the test set. The RMSD distributions of the training set and test set are very similar (Figure S5B), which indicates that the parameters are not over-fitted (i.e., too sensitive towards the data).

Supplementary Information and macro download

Two tutorial movies illustrate the installation and use of the macro. The evolution of the X,Y-coordinates is shown for the manual and computer tracking of the anterior and posterior centrosomes.

The macro, the tutorial movies, a user guide, input and processed movies can also be downloaded for our website <http://www.ens-lyon.fr/LBMC/simbio/software.html>

Supporting Information

File S1 Contains 6 text files to install the ACT macro: 1) ACT_Motor_CommandLine.txt, 2) ACT_Table_CommandLine_creation.txt, 3) CMD_SUM.txt, 4) Installation.txt, 5) Readme.txt, 6) LICENSE.txt. (ZIP)

Figure S1 Architecture of the ACT macro. **A:** Graphical User Interface. The steps requiring user intervention are indicated with a specific icon and bold edge. The parameters that the user has to enter are indicated on the embryo image (3). The input and output

flows are represented as dotted lines. **B:** Tracking program. Using the input parameters specified in A, the macro performs automatically the tracking for each pre-processed movie. (TIF)

Figure S2 Robustness of the tracking engine toward the initial centrosome position. The user-detected initial position of the centrosomes was varied up to 1.2 μm (with a spacing of 0.129 μm) yielding about 348 different starting positions. For each starting position, the centrosomes were tracked with the ACT macro and the RMSD of the entire trajectory (global RMSD) was calculated with respect to the reference tracking (i.e., the tracking that started from the user-detected central position). For all 348 analyses, the tracked centrosome positions were then displayed as dots on frames 1 to 40 after the initiation of the tracking process. The dots were colored according to their global RMSD (using the color scale shown on the bottom). The percentage indicates the fraction of analyses without any deviation from the reference tracking in the corresponding frame. After 40 frames (20 seconds), even the most extreme initial deviations caught up with the reference tracking. (TIF)

Figure S3 Scoring of the automated tracking as a function of the parameter values *hbb* and *dsc*. **A:** A coarse-grained surface of the scoring function (*SF*) is shown for the analysis in forward direction for the anterior (left) and posterior centrosome (right). The unit of *SF* is μm . **B:** Same as A but for the analysis in backward direction. (TIF)

Figure S4 Fine-grained surface of the scoring function. **A:** The scan of parameter values for the anterior centrosome (left) was performed only in forward direction; the posterior centrosome (right) was analyzed only in backward direction. The unit of *SF* is μm . **B:** Same as A but skipping four movies with the largest deviation from the manually-tracked trajectories. (TIF)

Figure S5 Optimization of the tracking parameters of the ACT macro. The ACT macro parameters were optimized using a training set of 36 movies. The upper left panel presents the distribution of the RMSD values of the movies for the anterior centrosome with the initial (light cyan) or optimized (dark cyan) parameters. Results for the posterior centrosome are presented on the upper right panel (light magenta and dark magenta for the initial and optimized parameters respectively). The improvement of the optimized parameters on ACT accuracy was challenged on a test set composed of 18 movies. The results for anterior and posterior centrosomes are displayed in the lower left and right panel respectively. On these two graphs the RMSD distribution between human is also displayed as a black curve. The human eye sensitivity (which we defined as the mean value of the RMSD “Human vs Human” including twice the standard deviation, i.e., $\text{RMSD} + 2\sigma$) is represented as a grey dotted line on each graph. The curves were constructed with a bin size of 0.1 μm . (TIF)

Table S1 description of the 85 analyzed movies. (TIF)

Table S2 Optimized positioning of the boundary box. (TIF)

Tutorial Movie S1 Explains how to run ACT under ImageJ. (MP4)

Tutorial Movie S2 Explains how to install ACT on your computer. (MP4)

Video S1 Raw DIC movie of a wild type *C. elegans* N2 embryo. The anterior pole is to the left. (AVI)

Video S2 Output movie of Video S1 using the ACT macro. (AVI)

Video S3 Input movie of a *C. elegans* N2 embryo treated by RNAi against the *klp-7(mcak)* gene. The anterior pole is to the left. (AVI)

Video S4 Output movie of Video S3 using the ACT macro, corresponding to Figure 4. (AVI)

Video S5 Input movie of a wild-type *C. species 10* JU1333 embryo. The anterior pole is to the left. (AVI)

Video S6 Output movie of a Video S5, using the ACT macro. (AVI)

Video S7 Input movie of a wild-type *C. briggsae* JU1018 embryo. The anterior pole is to the left. (AVI)

Video S8 Output movie of Video S7, using the ACT macro. (AVI)

Video S9 Input movie used to illustrate a failed tracking. The anterior pole is to the left. (AVI)

Video S10 Output movie of Video S9 showing a failed tracking using the ACT macro. (AVI)

Video S11 Input movie used to illustrate a failed tracking at early steps of mitosis. The anterior pole is to the left. (AVI)

Video S12 Output movie of Video S11 showing that the computer program failed to track centrosomes early in mitosis but eventually recovers for the rest of the movie. (AVI)

Acknowledgments

We thank Gaël Yvert for critical reading of the manuscript. We are grateful to the Fédération Lyonnaise de Modélisation et Sciences Numériques (FLMSN) and the Pôle Scientifique et Modélisation Numérique (PSMN) for providing CPU time and technical assistance. We thank the Hyman and Félix laboratories for providing strains. Some nematode strains used in this work were also provided by the Caenorhabditis Genetics Center, which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCRR).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MD DC MS. Performed the experiments: DC PNS SR MS MD. Analyzed the data: DC PNS MS MD. Contributed reagents/materials/analysis tools: DC PNS SR. Wrote the paper: DC MS MD.

References

1. Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, et al. (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408: 325–330.
2. Gönczy P, Echeverri C, Oegema K, Coulson A, Jones SJ, et al. (2000) Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* 408: 331–336.
3. Knoblich JA (2010) Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 849–860.
4. Morin X, Bellaiche Y (2011) Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev Cell* 21: 102–119.
5. Grill SW, Howard J, Schaffer E, Stelzer EH, Hyman AA (2003) The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* 301: 518–521.
6. Pecreaux J, Roper JC, Kruse K, Julicher F, Hyman AA, et al. (2006) Spindle oscillations during asymmetric cell division require a threshold number of active cortical force generators. *Curr Biol* 16: 2111–2122.
7. Kozłowski C, Srayko M, Nedelec F (2007) Cortical microtubule contacts position the spindle in *C. elegans* embryos. *Cell* 129: 499–510.
8. Kimura A, Onami S (2005) Computer simulations and image processing reveal length-dependent pulling force as the primary mechanism for *C. elegans* male pronuclear migration. *Dev Cell* 8: 765–775.
9. Jaensch S, Decker M, Hyman AA, Myers EW (2010) Automated tracking and analysis of centrosomes in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Bioinformatics* 26: i13–20.
10. Brauchle M, Kiontke K, Macmenamin P, Fitch DH, Piano F (2009) Evolution of early embryogenesis in rhabditid nematodes. *Dev Biol*.
11. Riche S, Zouak M, Argoul F, Arneodo A, Pecreaux J, et al. (2013) Evolutionary comparisons reveal a positional switch for spindle pole oscillations in *Caenorhabditis* embryos. *J Cell Biol* 201: 653–662.

	Strains	Description	Oscillations compared to WT <i>C. elegans</i>	n	Total
Training Set	N2	Wild type <i>C. elegans</i>		3	36
	RB1150	<i>C. elegans gpr-2</i> mutant	lower	12	
	VC1670	<i>C. elegans gpr-1</i> mutant	lower	3	
	ED3036	Wild type <i>C. briggsae</i>	lower	10	
	JU1018_28°C	Wild type <i>C. briggsae</i> recorded at 28°C	lower	9	
Test Set	N2	Wild type <i>C. elegans</i>		3	18
	JU1018	Wild type <i>C. briggsae</i>	lower	4	
	XA3501	<i>C. elegans gfp::his</i>		3	
	ANA058	<i>C. elegans gfp::his; gfp::ytub</i>		3	
	ANA058 <i>klp-3</i> (RNAi)	<i>C. elegans gfp::his; gfp::ytub klp-3</i> (RNAi)	lower	3	
	N2 <i>mcak-1</i> (RNAi)	<i>C. elegans mcak-1</i> (RNAi)	higher	2	
Visual Inspection	QR24	Wild type <i>C. briggsae</i>	lower	9	85
	JU1333	Wild type <i>C. sp10</i>	lower	3	
	JU1771	Wild type <i>C. sp10</i>	lower	6	
	TH251	<i>C. elegans yfp::gpr-1</i>	higher	6	
	ANA017	<i>C. briggsae gfp::gpr-2</i>	lower	10	
	N2 <i>let-99</i> (RNAi)	<i>C. elegans let-99</i> (RNAi)	higher	7	
	N2 <i>C27D9.1</i> (RNAi)	<i>C. elegans</i> with long embryos		5	
	N2 <i>pqn-59</i> (RNAi)	<i>C. elegans</i> with short embryos		1	
	N2 <i>cid-1</i> (RNAi)	<i>C. elegans</i> with short embryos		8	
	ANA037 <i>Cegpr-1/2</i> (RNAi)	<i>C. briggsae Cegpr-1/2</i> (RNAi)	lower	14	
	JU1018 <i>gpb-1</i> (RNAi)	<i>C. briggsae gpb-1</i> (RNAi)	higher	8	
	N2 <i>mcak-1</i> (RNAi)	<i>C. elegans mcak-1</i> (RNAi)	higher	8	

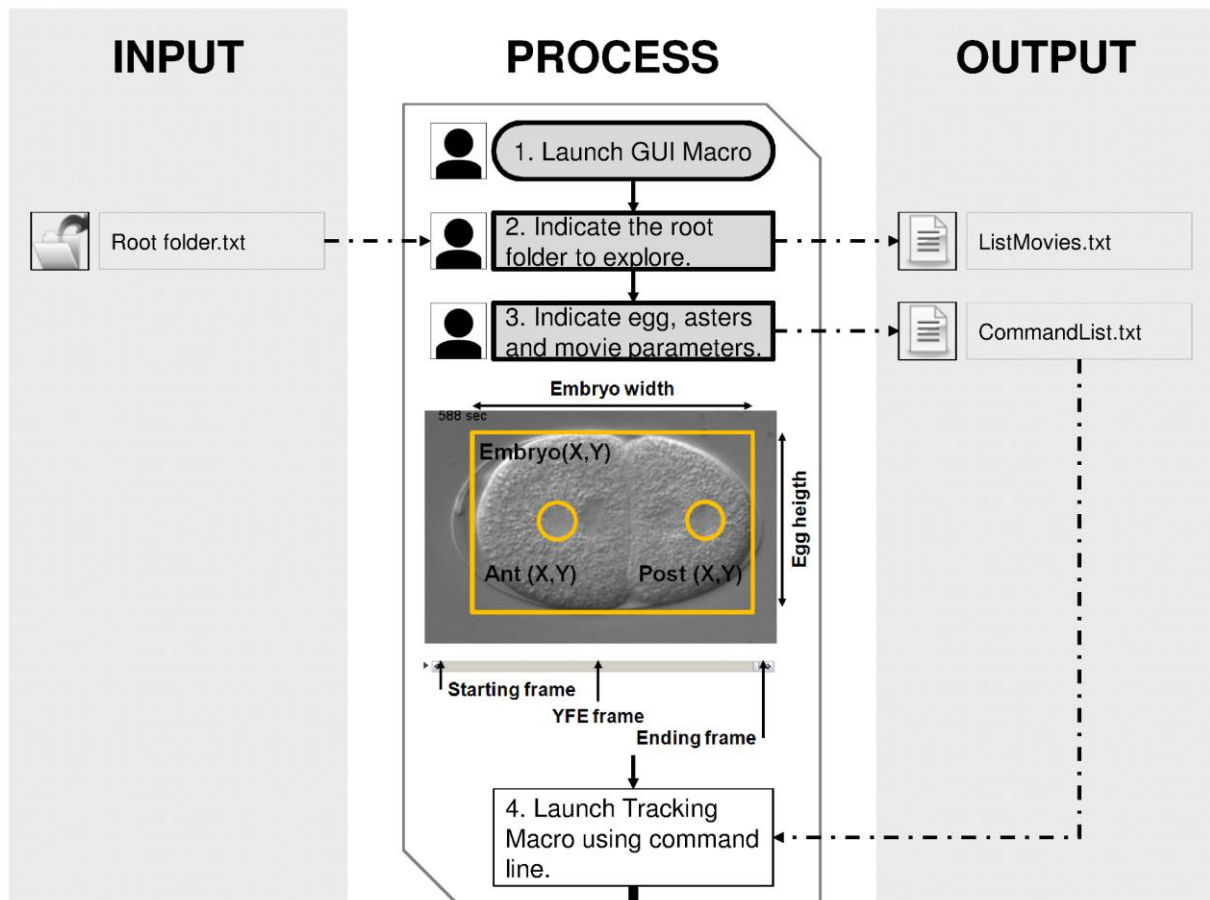
Table S1: Description of analyzed movies.

	Coordinate	Upper left corner ^a	Down right corner ^a
Anterior centrosome optimized (Retrograde)	X	$X_c - 1/2*(hbb)$	$X_c + 1$
	Y	$Y_c - 1/2*(hbb)$	$Y_c + 1/2*(hbb)$
Posterior centrosome optimized	X	$X_c - 1$	$X_c + 1/2*(hbb)$
	Y	$Y_c - 1/2*(hbb)$	$Y_c + 1/2*(hbb)$

^a X_c and Y_c are the last known coordinates of the tracked centrosome.

Table S2: Optimized positioning of the boundary box for the tracking of the anterior (called Retrograde) and posterior centrosome.

A



B

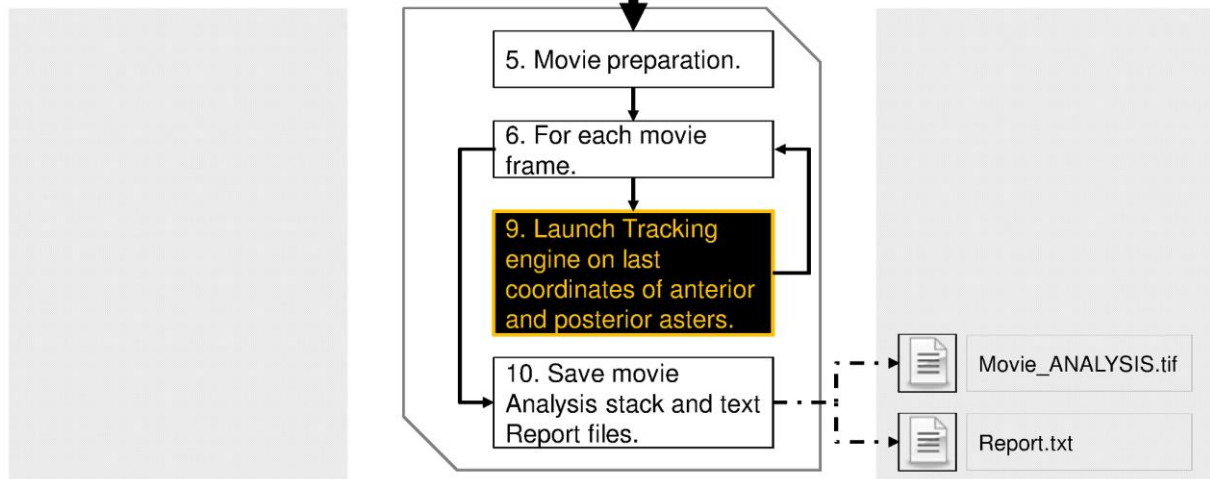


Figure S1: Architecture of the ACT macro. A: Graphical User Interface. The steps requiring user intervention are indicated with a specific icon and bold edge. The parameters that the user has to enter are indicated on the embryo image (3). The input and output flows are represented as dotted lines. B: Tracking program. Using the input parameters specified in A, the macro performs automatically the tracking for each pre-processed movie.

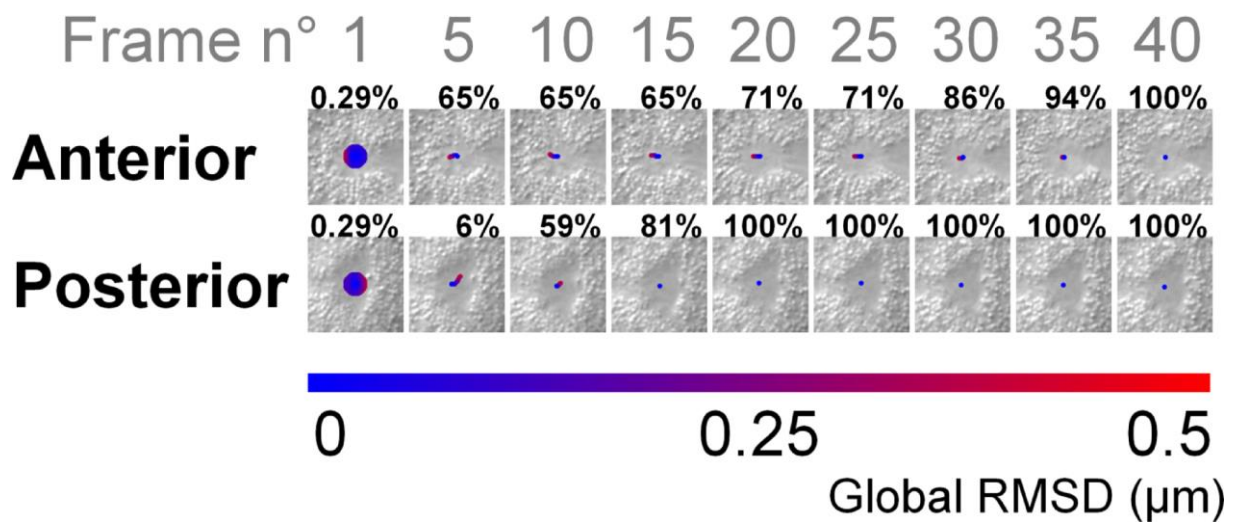


Figure S2: Robustness of the tracking engine toward the initial centrosome position. The user-detected initial position of the centrosomes was varied up to 1.2 μm (with a spacing of 0.129 μm) yielding about 348 different starting positions. For each starting position, the centrosomes were tracked with the ACT macro and the RMSD of the entire trajectory (global RMSD) was calculated with respect to the reference tracking (i.e., the tracking that started from the user-detected central position). For all 348 analyses, the tracked centrosome positions were then displayed as dots on frames 1 to 40 after the initiation of the tracking process. The dots were colored according to their global RMSD (using the color scale shown on the bottom). The percentage indicates the fraction of analyses without any deviation from the reference tracking in the corresponding frame. After 40 frames (20 seconds), even the most extreme initial deviations caught up with the reference tracking.

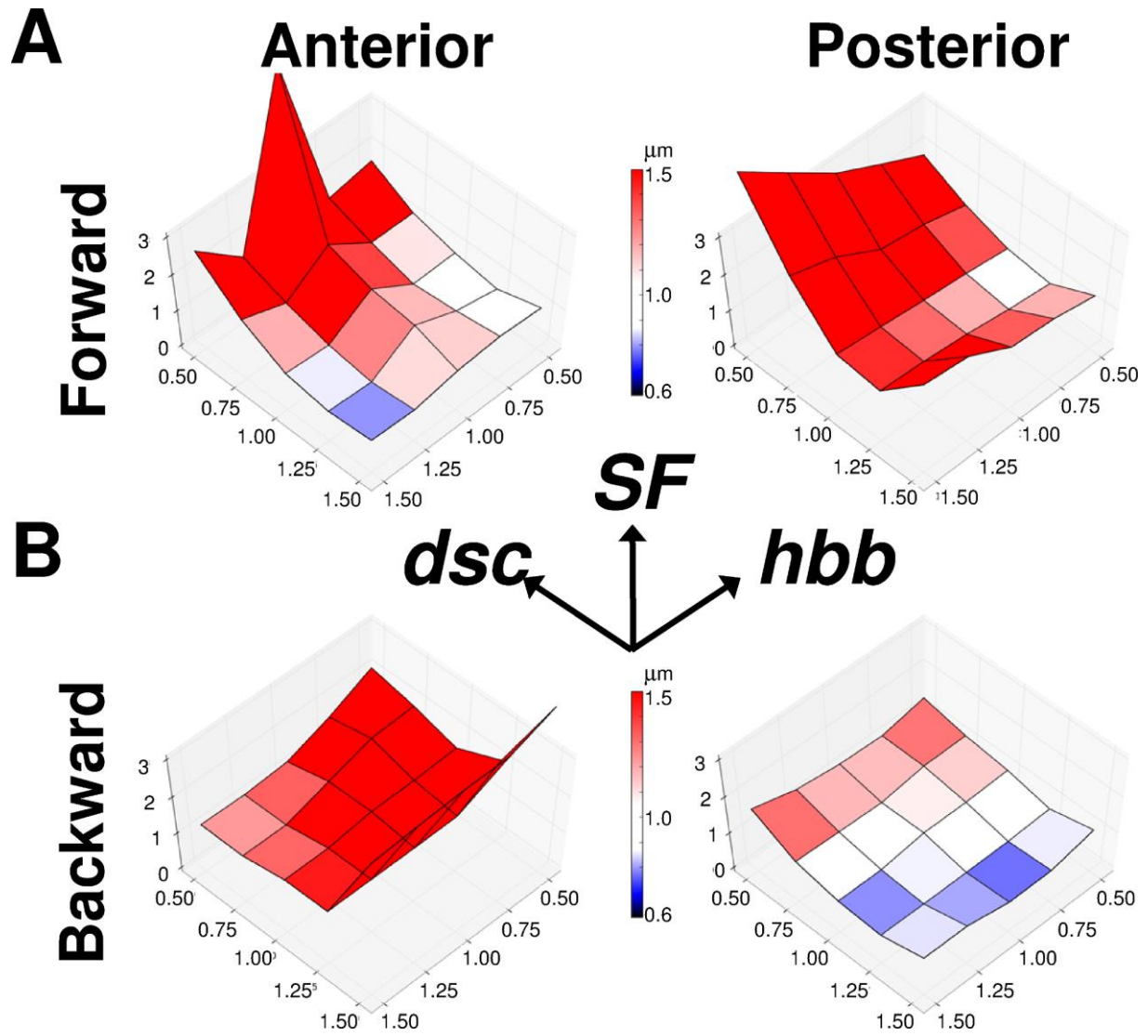


Figure S3: Scoring of the automated tracking as a function of the parameter values hbb and dsc . **A:** A coarse-grained surface of the scoring function (SF) is shown for the analysis in forward direction for the anterior (left) and posterior centrosome (right). The unit of SF is μm . **B:** Same as A but for the analysis in backward direction.

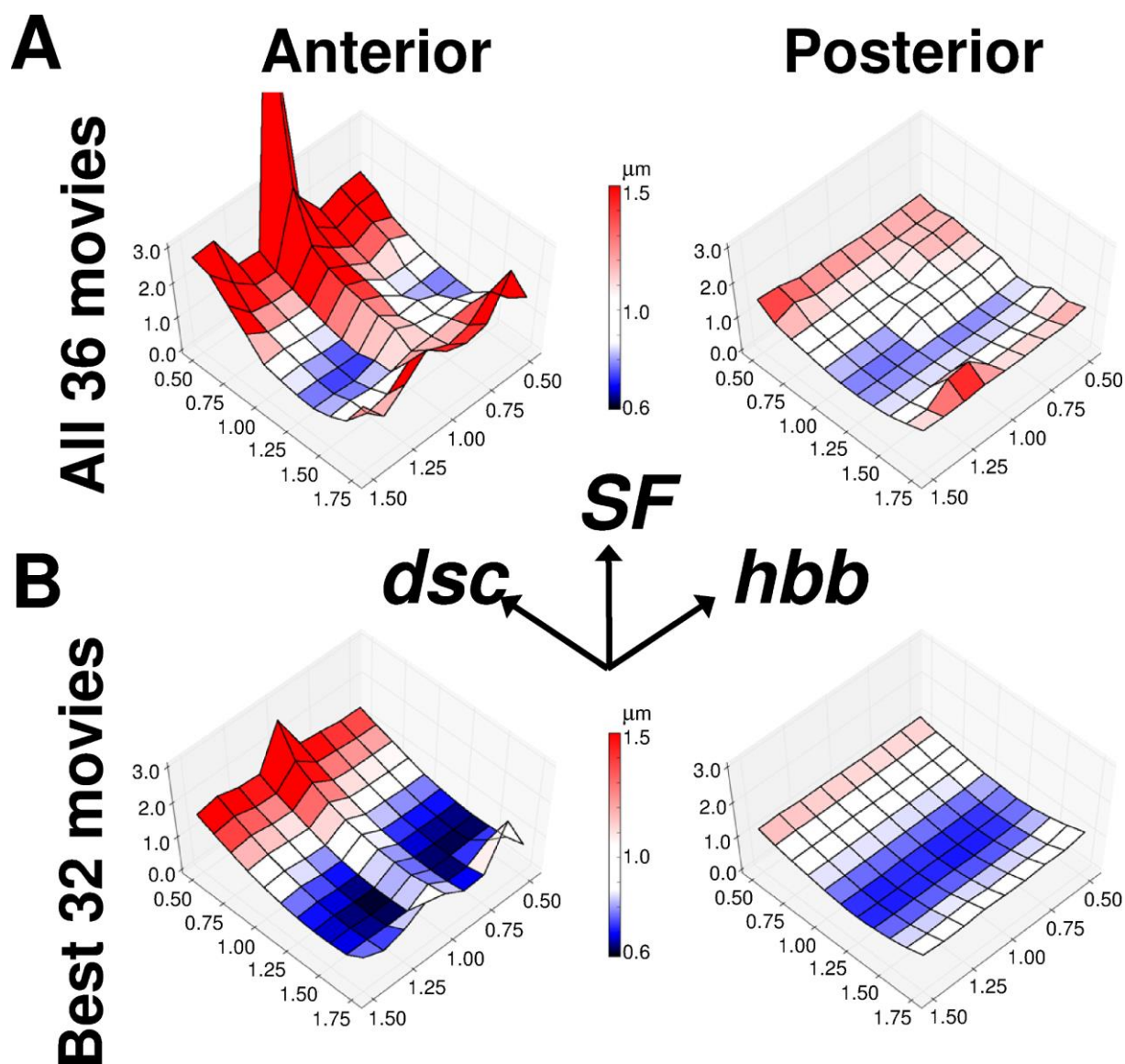
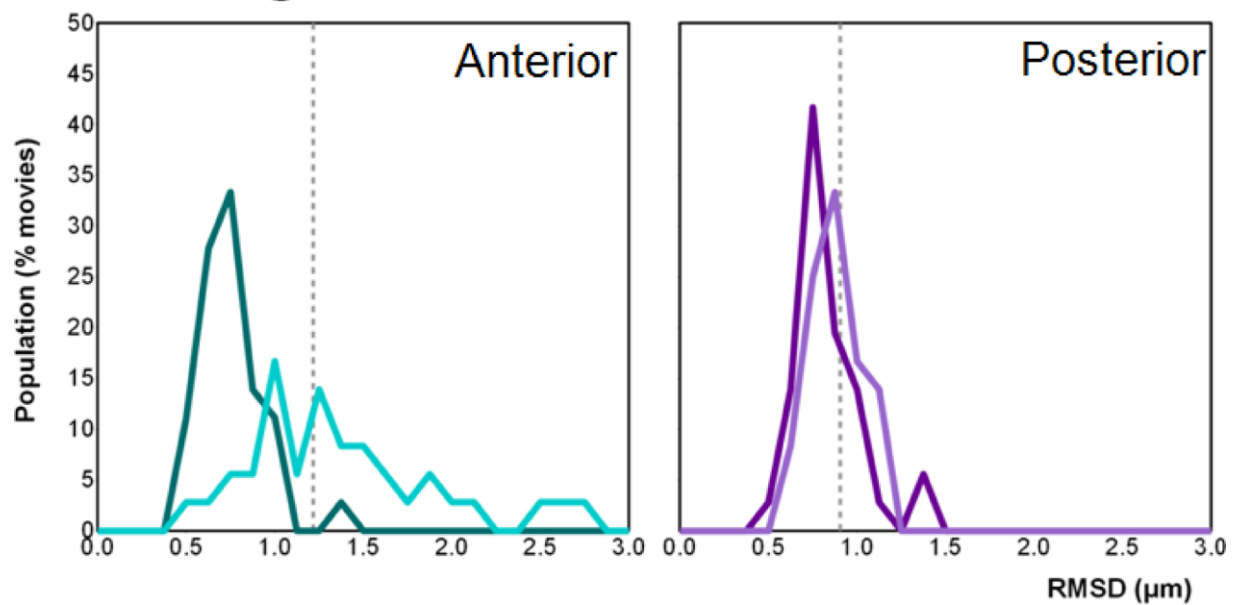
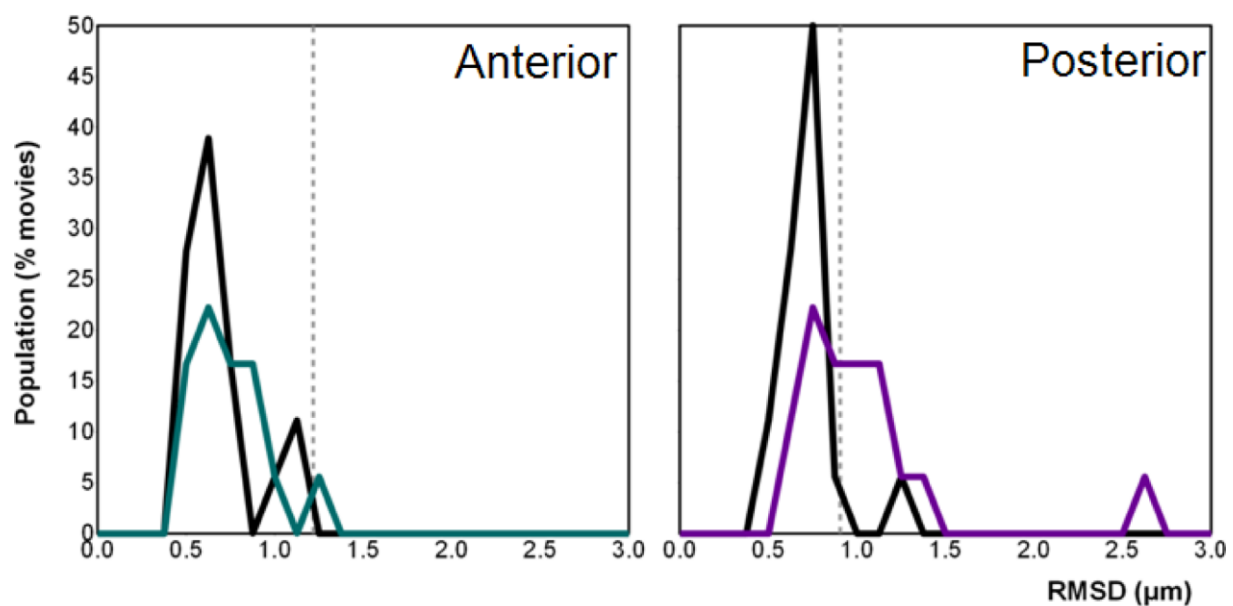


Figure S4: Fine-grained surface of the scoring function. A: The scan of parameter values for the anterior centrosome (left) was performed only in forward direction; the posterior centrosome (right) was analyzed only in backward direction. The unit of SF is μm . B: Same as A but skipping four movies with the largest deviation from the manually-tracked trajectories.

Training set



Test set



— Human vs Human

— ACT
initial parameters

— ACT
optimized parameters

— Human vs Human

— ACT
initial parameters

— ACT
optimized parameters

Figure S5: Optimization of the tracking parameters of the ACT macro. The ACT macro parameters were optimized using a training set of 36 movies. The upper left panel presents the distribution of the RMSD values of the movies for the anterior centrosome with the initial (light cyan) or optimized (dark cyan) parameters. Results for the posterior centrosome are presented on the upper right panel (light magenta and dark magenta for the initial and optimized parameters respectively). The improvement of the optimized parameters on ACT accuracy was challenged on a test set composed of 18 movies. The results for anterior and posterior centrosomes are displayed in the lower left and right panel respectively. On these two graphs the RMSD distribution between human is also displayed as a black curve. The human eye sensitivity (which we defined as the mean value of the RMSD “Human vs Human” including twice the standard deviation, i.e.,) is represented as a grey dotted line on each graph. The curves were constructed with a bin size of 0.1 μm .

Conclusion générale

Les cellules sont l'unité de base des organismes et les grandes fonctions cellulaires sont très conservées au cours de l'évolution. Cette constatation a conduit les chercheurs à se concentrer sur la constance des fonctions cellulaires et à ignorer les variations qui peuvent exister d'une espèce à l'autre pour exécuter une même fonction cellulaire. Ainsi, peu de travaux ont permis à ce jour d'explorer la question de l'évolution des processus cellulaires. Mon travail de thèse a consisté à explorer l'évolution d'une fonction cellulaire essentielle : le positionnement du fuseau mitotique pendant la division cellulaire asymétrique. J'ai montré que dans deux espèces proches de nématodes subissant toutes deux une division asymétrique, les mécanismes sous-jacents contrôlant le positionnement du fuseau mitotique avaient évolué. Ainsi, derrière un processus très conservé, se cachent différentes solutions. Cette évolution cryptique des mécanismes reflète également la diversité du vivant et doit être explorée pour comprendre quels changements évolutifs sont possibles et quelles contraintes empêchent les systèmes de changer. Mon travail a contribué à cette discipline naissante de l'Évolution de la Biologie Cellulaire (Lynch et al., 2014).

Nous avons vu que pour ces approches comparatives, l'utilisation d'organismes proches morphologiquement et physiologiquement est indispensable. Il est également nécessaire d'avoir des outils moléculaires et génétiques pour réaliser des approches fonctionnelles dans les espèces non modèles. Le développement de telles techniques dans les espèces satellites est donc une condition préalable essentielle pour entreprendre ces études comparatives. Nous avons montré que l'embryon de *C. briggsae* présente de nombreux avantages pour entreprendre ce type d'approche. Les outils et les lignées transgéniques que nous avons mis en place pourraient désormais servir à décrypter l'évolution d'autres mécanismes cellulaires. Notamment, nous n'avons pas exploré le mécanisme qui conduit à l'overcentration des noyaux dans cette espèce. Nous avons aussi constaté que les contractions corticales sont très réduites pendant l'établissement de la polarité chez *C. briggsae* par rapport à *C. elegans*. Ceci suggère qu'une régulation différente du réseau d'actomyosine s'opère dans cette espèce par rapport à *C. elegans*. Étudier ce processus dans *C. briggsae* pourrait permettre de révéler les différentes stratégies possibles permettant l'établissement de la polarité.

En nous concentrant sur l'espèce *C. briggsae* qui présente une overcentration des pronoyaux en prophase et des oscillations réduites du fuseau en mitose, nous avons pu révéler un nouveau mécanisme impliqué dans le contrôle des oscillations du fuseau, et révéler des divergences dans la régulation de GPR. L'équipe a quantifié les mouvements du fuseau dans 40 autres espèces de nématodes, pour lesquelles la division embryonnaire est toujours asymétrique. De nombreuses différences des profils d'oscillations et d'élongation du fuseau ont été observées, différents de *C. elegans* et différents de *C. briggsae*. Par exemple, il existe des espèces pour lesquelles il n'y a aucune oscillation du fuseau, d'autres pour lesquelles les oscillations antérieures et postérieures sont identiques, d'autres encore pour lesquelles les oscillations sont très prononcées alors que le fuseau est déjà positionné postérieurement en début de mitose. Une analyse précise des variations par rapport à *C. elegans* dans certaines de ces espèces, comme j'ai pu le faire pour *C. briggsae* permettrait certainement de révéler d'autres mécanismes essentiels de régulation des forces mécaniques.

Mon travail a cependant été ralenti et n'a pas toujours abouti, notamment car nous nous sommes confrontés au processus de silencing des transgènes dans la lignée germinale et l'embryon. Nous avons ainsi rencontré beaucoup de problèmes lors de la création de lignées transgéniques essentielles à ces études et beaucoup de conclusions manquent encore quant à la corrélation des domaines protéiques sur les mouvements des pronoyaux et du fuseau. Également, le projet de caractérisation de la dynamique de GPR par rapport aux mouvements des structures intracellulaires a dû être mis de côté alors qu'il était très prometteur. Établir ces lignées transgéniques par la nouvelle technique CRISPR/Cas9 sera peut-être une stratégie efficace pour limiter le silencing (Friedland et al., 2013). Cependant, aucune donnée à ce jour ne permet de quantifier le silencing de telles lignées par rapport à celles obtenues avec les techniques telles que MosSCI ou bombardement. Ainsi, comprendre le mécanisme du silencing reste un enjeu majeur. Identifier des stratégies pour le contrer nous permettra d'appréhender de nouveau les projets mis à l'écart faute de lignées disponibles. Il sera également essentiel pour l'étude d'autres espèces de nématodes, dans lesquelles le silencing semble également très prononcé.

BIBLIOGRAPHIE

- Adames, N.R., and Cooper, J.A. (2000). Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *149*, 863–874.
- Adams, R.J. (1996). Metaphase spindles rotate in the neuroepithelium of rat cerebral cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *16*, 7610–7618.
- Adams, D.W., and Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat. Rev. Microbiol.* *7*, 642–653.
- Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Johnston, C.A., McCudden, C.R., Siderovski, D.P., and Gönczy, P. (2004). RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent Galpha function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell* *119*, 219–230.
- Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Siderovski, D.P., and Gonczy, P. (2005). Cortical localization of the G protein GPA-16 requires RIC-8function during *C. elegans* asymmetric cell division. *Development* *132*, 4449–4459.
- Baum, B., and Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J. Cell Biol.* *192*, 907–917.
- Beldade, P., and Brakefield, P.M. (2002). The genetics and evo-devo of butterfly wing patterns. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 442–452.
- Bellaïche, Y., Radovic, A., Woods, D.F., Hough, C.D., Parmentier, M.L., O’Kane, C.J., Bryant, P.J., and Schweisguth, F. (2001). The Partner of Inscuteable/Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Cell* *106*, 355–366.
- Bellanger, J.-M., and Gönczy, P. (2003). TAC-1 and ZYG-9 Form a Complex that Promotes Microtubule Assembly in *C. elegans* Embryos. *Curr. Biol.* *13*, 1488–1498.
- Bellanger, J.-M., Carter, J.C., Phillips, J.B., Canard, C., Bowerman, B., and Gönczy, P. (2007). ZYG-9, TAC-1 and ZYG-8 together ensure correct microtubule function throughout the cell cycle of *C. elegans* embryos. *J. Cell Sci.* *120*, 2963–2973.
- Bossinger, O., Klebes, A., Segbert, C., Theres, C., and Knust, E. (2001). Zonula adherens formation in *Caenorhabditis elegans* requires *dlg-1*, the homologue of the *Drosophila* gene discs large. *Dev. Biol.* *230*, 29–42.
- Bowman, S.K., Neumüller, R.A., Novatchkova, M., Du, Q., and Knoblich, J.A. (2006). The *Drosophila* NuMA Homolog Mud Regulates Spindle Orientation in Asymmetric Cell Division. *Dev. Cell* *10*, 731–742.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 71–94.
- C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* *282*, 2012–2018.

- Cheeks, R.J., Canman, J.C., Gabriel, W.N., Meyer, N., Strome, S., and Goldstein, B. (2004). *C. elegans* PAR proteins function by mobilizing and stabilizing asymmetrically localized protein complexes. *Curr. Biol. CB* 14, 851–862.
- Colombo, K., Grill, S.W., Kimple, R.J., Willard, F.S., Siderovski, D.P., and Gönczy, P. (2003). Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Science* 300, 1957–1961.
- Cottingham, F.R., and Hoyt, M.A. (1997). Mitotic spindle positioning in *Saccharomyces cerevisiae* is accomplished by antagonistically acting microtubule motor proteins. *J. Cell Biol.* 138, 1041–1053.
- Couwenbergs, C., Spilker, A.C., and Gotta, M. (2004). Control of embryonic spindle positioning and Galpha activity by *C. elegans* RIC-8. *Curr. Biol. CB* 14, 1871–1876.
- Cowan, C.R., and Hyman, A.A. (2004). Centrosomes direct cell polarity independently of microtubule assembly in *C. elegans* embryos. *Nature* 431, 92–96.
- Cuenca, A.A., Schetter, A., Aceto, D., Kempfues, K., and Seydoux, G. (2003). Polarization of the *C. elegans* zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases. *Dev. Camb. Engl.* 130, 1255–1265.
- Culurgioni, S., Alfieri, A., Pendolino, V., Laddomada, F., and Mapelli, M. (2011). Inscuteable and NuMA proteins bind competitively to Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein (LGN) during asymmetric cell divisions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 20998–21003.
- Dekanty, A., Barrio, L., Muzzopappa, M., Auer, H., and Milán, M. (2012). Aneuploidy-induced delaminating cells drive tumorigenesis in *Drosophila* epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 20549–20554.
- Dolinski, C., Baldwin, J.G., and Thomas, W.K. (2001). Comparative survey of early embryogenesis of Secernentea (Nematoda), with phylogenetic implications. *Can. J. Zool.* 79, 82–94.
- Du, Q., and Macara, I.G. (2004). Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell* 119, 503–516.
- Du, Q., Stukenberg, P.T., and Macara, I.G. (2001). A mammalian Partner of inscuteable binds NuMA and regulates mitotic spindle organization. *Nat. Cell Biol.* 3, 1069–1075.
- Du, Q., Taylor, L., Compton, D.A., and Macara, I.G. (2002). LGN blocks the ability of NuMA to bind and stabilize microtubules: a mechanism for mitotic spindle assembly regulation. *Curr. Biol.* 12, 1928–1933.
- Félix, M.A., De Ley, P., Sommer, R.J., Frisse, L., Nadler, S.A., Thomas, W.K., Vanfleteren, J., and Sternberg, P.W. (2000). Evolution of vulva development in the Cephalobina (Nematoda). *Dev. Biol.* 221, 68–86.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811.
- Firestein, B.L., and Rongo, C. (2001). DLG-1 is a MAGUK similar to SAP97 and is required for adherens junction formation. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3465–3475.
- Fisk Green, R., Lorson, M., Walhout, A.J.M., Vidal, M., and van den Heuvel, S. (2004). Identification of critical domains and putative partners for the *Caenorhabditis elegans* spindle component LIN-5. *Mol. Genet. Genomics* **271**, 532–544.
- Friedland, A.E., Tzur, Y.B., Esvelt, K.M., Colaiácovo, M.P., Church, G.M., and Calarco, J.A. (2013). Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat. Methods* **10**, 741–743.
- Frøkjær-Jensen, C., Davis, M.W., Sarov, M., Taylor, J., Flibotte, S., LaBella, M., Pozniakovsky, A., Moerman, D.G., and Jorgensen, E.M. (2014). Random and targeted transgene insertion in *Caenorhabditis elegans* using a modified Mos1 transposon. *Nat. Methods* **11**, 529–534.
- Galli, M., Muñoz, J., Portegijs, V., Boxem, M., Grill, S.W., Heck, A.J.R., and van den Heuvel, S. (2011). aPKC phosphorylates NuMA-related LIN-5 to position the mitotic spindle during asymmetric division. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1132–1138.
- Goldstein, B. (2001). On the evolution of early development in the Nematoda. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **356**, 1521–1531.
- Goldstein, B., and Hird, S.N. (1996). Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Camb. Engl.* **122**, 1467–1474.
- Goldstein, B., Frisse, L.M., and Thomas, W.K. (1998). Embryonic axis specification in nematodes: evolution of the first step in development. *Curr. Biol. CB* **8**, 157–160.
- Gönczy, P. (2008). Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 355–366.
- Gönczy, P., Schnabel, H., Kaletta, T., Amores, A.D., Hyman, T., and Schnabel, R. (1999). Dissection of cell division processes in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo by mutational analysis. *J. Cell Biol.* **144**, 927–946.
- Gönczy, P., Echeverri, C., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S.J., Copley, R.R., Duperon, J., Oegema, J., Brehm, M., Cassin, E., et al. (2000). Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* **408**, 331–336.
- Gordon, M.B., Howard, L., and Compton, D.A. (2001). Chromosome movement in mitosis requires microtubule anchorage at spindle poles. *J. Cell Biol.* **152**, 425–434.
- Gotta, M., and Ahringer, J. (2001). Distinct roles for Galpha and Gbetagamma in regulating spindle position and orientation in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nat. Cell Biol.* **3**, 297–300.

- Gotta, M., Abraham, M.C., and Ahringer, J. (2001). CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **11**, 482–488.
- Gotta, M., Dong, Y., Peterson, Y.K., Lanier, S.M., and Ahringer, J. (2003). Asymmetrically distributed *C. elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Curr. Biol.* **13**, 1029–1037.
- Grill, S.W., Gönczy, P., Stelzer, E.H., and Hyman, A.A. (2001). Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature* **409**, 630–633.
- Grill, S.W., Howard, J., Schäffer, E., Stelzer, E.H., and Hyman, A.A. (2003). The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* **301**, 518–521.
- Guo, S., and Kemphues, K.J. (1996). A non-muscle myosin required for embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **382**, 455–458.
- Gusnowski, E.M., and Srayko, M. (2011). Visualization of dynein-dependent microtubule gliding at the cell cortex: implications for spindle positioning. *J. Cell Biol.* **194**, 377–386.
- Haag, E.S. (2014). The Same but Different: Worms Reveal the Pervasiveness of Developmental System Drift. *PLoS Genet* **10**, e1004150.
- Hao, Y., Du, Q., Chen, X., Zheng, Z., Balsbaugh, J.L., Maitra, S., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Macara, I.G. (2010). Par3 Controls Epithelial Spindle Orientation by aPKC-Mediated Phosphorylation of Apical Pins. *Curr. Biol.* **20**, 1809–1818.
- Haydar, T.F., Ang, E., and Rakic, P. (2003). Mitotic spindle rotation and mode of cell division in the developing telencephalon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2890–2895.
- Hess, H.A., Röper, J.-C., Grill, S.W., and Koelle, M.R. (2004). RGS-7 completes a receptor-independent heterotrimeric G protein cycle to asymmetrically regulate mitotic spindle positioning in *C. elegans*. *Cell* **119**, 209–218.
- Hill, D.P., and Strome, S. (1988). An analysis of the role of microfilaments in the establishment and maintenance of asymmetry in *Caenorhabditis elegans* zygotes. *Dev. Biol.* **125**, 75–84.
- Hird, S.N., and White, J.G. (1993). Cortical and cytoplasmic flow polarity in early embryonic cells of *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **121**, 1343–1355.
- Hochbaum, D., Ferguson, A.A., and Fisher, A.L. (2010). Generation of transgenic *C. elegans* by biolistic transformation. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Izaki, T., Kamakura, S., Kohjima, M., and Sumimoto, H. (2006). Two forms of human Inscuteable-related protein that links Par3 to the Pins homologues LGN and AGS3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 1001–1006.

Izumi, Y., Ohta, N., Itoh-Furuya, A., Fuse, N., and Matsuzaki, F. (2004). Differential functions of G protein and Baz-aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division. *J. Cell Biol.* *164*, 729–738.

Izumi, Y., Ohta, N., Hisata, K., Raabe, T., and Matsuzaki, F. (2006). *Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat. Cell Biol.* *8*, 586–593.

Jenkins, N., Saam, J.R., and Mango, S.E. (2006). CYK-4/GAP provides a localized cue to initiate anteroposterior polarity upon fertilization. *Science* *313*, 1298–1301.

Johnston, C.A., Hirono, K., Prehoda, K.E., and Doe, C.Q. (2009). Identification of an Aurora-A/PinsLINKER/ Dlg Spindle Orientation Pathway using Induced Cell Polarity in S2 Cells. *Cell* *138*, 1150–1163.

Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., et al. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* *421*, 231–237.

Kennedy, M.J., Hughes, R.M., Peteya, L.A., Schwartz, J.W., Ehlers, M.D., and Tucker, C.L. (2010). Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat. Methods* *7*, 973–975.

Kimura, A., and Onami, S. (2005). Computer Simulations and Image Processing Reveal Length-Dependent Pulling Force as the Primary Mechanism for Male Pronuclear Migration. *Dev. Cell* *8*, 765–775.

Kimura, A., and Onami, S. (2007). Local cortical pulling-force repression switches centrosomal centration and posterior displacement in *C. elegans*. *J. Cell Biol.* *179*, 1347–1354.

Kimura, K., and Kimura, A. (2010). Intracellular organelles mediate cytoplasmic pulling force for centrosome centration in the *Caenorhabditis elegans* early embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 137–142.

Kiontke, K., Barrière, A., Kolotuev, I., Podbilewicz, B., Sommer, R., Fitch, D.H.A., and Félix, M.-A. (2007). Trends, Stasis, and Drift in the Evolution of Nematode Vulva Development. *Curr. Biol.* *17*, 1925–1937.

Kirby, C., Kusch, M., and Kemphues, K. (1990). Mutations in the par genes of *Caenorhabditis elegans* affect cytoplasmic reorganization during the first cell cycle. *Dev. Biol.* *142*, 203–215.

Klingenberg, C.P. (2010). Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 623–635.

Knoblich, J.A. (2010). Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 849–860.

Kotak, S., Busso, C., and Gonczy, P. (2012). Cortical dynein is critical for proper spindle positioning in human cells. *J. Cell Biol.* *199*, 97–110.

- Kozlowski, C., Srayko, M., and Nedelec, F. (2007). Cortical Microtubule Contacts Position the Spindle in *C. elegans* Embryos. *Cell* **129**, 499–510.
- Krueger, L.E., Wu, J.-C., Tsou, M.-F.B., and Rose, L.S. (2010). LET-99 inhibits lateral posterior pulling forces during asymmetric spindle elongation in *C. elegans* embryos. *J. Cell Biol.* **189**, 481–495.
- Labbé, J.-C., McCarthy, E.K., and Goldstein, B. (2004). The forces that position a mitotic spindle asymmetrically are tethered until after the time of spindle assembly. *J. Cell Biol.* **167**, 245–256.
- Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2012). Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 737–746.
- Lorson, M.A., Horvitz, H.R., and van den Heuvel, S. (2000). LIN-5 is a novel component of the spindle apparatus required for chromosome segregation and cleavage plane specification in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **148**, 73–86.
- Loughlin, R., Wilbur, J.D., McNally, F.J., Nédélec, F.J., and Heald, R. (2011). Katanin Contributes to Interspecies Spindle Length Scaling in *Xenopus*. *Cell* **147**, 1397–1407.
- Lu, M.S., and Prehoda, K.E. (2013). A NudE/14-3-3 pathway coordinates dynein and the kinesin Khc73 to position the mitotic spindle. *Dev. Cell* **26**, 369–380.
- Lynch, M., Field, M.C., Goodson, H.V., Malik, H.S., Pereira-Leal, J.B., Roos, D.S., Turkewitz, A.P., and Sazer, S. (2014). Evolutionary cell biology: two origins, one objective. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 16990–16994.
- Mausser, J.F., and Prehoda, K.E. (2012). Inscuteable regulates the Pins-Mud spindle orientation pathway. *PLoS One* **7**, e29611.
- McCarthy Campbell, E.K., Werts, A.D., and Goldstein, B. (2009). A cell cycle timer for asymmetric spindle positioning. *PLoS Biol.* **7**, e1000088.
- Merdes, A., Heald, R., Samejima, K., Earnshaw, W.C., and Cleveland, D.W. (2000). Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *J. Cell Biol.* **149**, 851–862.
- Mierzwa, B., and Gerlich, D.W. (2014). Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control. *Dev. Cell* **31**, 525–538.
- Moon, H.M., Youn, Y.H., Pemble, H., Yingling, J., Wittmann, T., and Wynshaw-Boris, A. (2014). LIS1 controls mitosis and mitotic spindle organization via the LIS1-NDEL1-dynein complex. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 449–466.
- Morin, X., Jaouen, F., and Durbec, P. (2007). Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nat. Neurosci.* **10**, 1440–1448.

- Motegi, F., and Sugimoto, A. (2006). Sequential functioning of the ECT-2 RhoGEF, RHO-1 and CDC-42 establishes cell polarity in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nat. Cell Biol.* 8, 978–985.
- Mumby, S.M., Heukeroth, R.O., Gordon, J.I., and Gilman, A.G. (1990). G-protein alpha-subunit expression, myristoylation, and membrane association in COS cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 728–732.
- Munro, E., Nance, J., and Priess, J.R. (2004). Cortical Flows Powered by Asymmetrical Contraction Transport PAR Proteins to Establish and Maintain Anterior-Posterior Polarity in the Early *C. elegans* Embryo. *Dev. Cell* 7, 413–424.
- Nahaboo, W., Zouak, M., Askjaer, P., and Delattre, M. (2015). Chromatids segregate without centrosomes during *Caenorhabditis elegans* mitosis in a Ran- and CLASP-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* 26, 2020–2029.
- Nguyen-Ngoc, T., Afshar, K., and Gönczy, P. (2007). Coupling of cortical dynein and G alpha proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Cell Biol.* 9, 1294–1302.
- Nipper, R.W., Siller, K.H., Smith, N.R., Doe, C.Q., and Prehoda, K.E. (2007). Galpha generates multiple Pins activation states to link cortical polarity and spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14306–14311.
- Noatynska, A., Gotta, M., and Meraldi, P. (2012). Mitotic spindle (DIS)orientation and DISease: Cause or consequence? *J. Cell Biol.* 199, 1025–1035.
- Nuez, I., and Félix, M.-A. (2012). Evolution of susceptibility to ingested double-stranded RNAs in *Caenorhabditis* nematodes. *PLoS One* 7, e29811.
- O'Rourke, S.M., Christensen, S.N., and Bowerman, B. (2010). *Caenorhabditis elegans* EFA-6 limits microtubule growth at the cell cortex. *Nat. Cell Biol.* 12, 1235–1241.
- Park, D.H., and Rose, L.S. (2008). Dynamic localization of LIN-5 and GPR-1/2 to cortical force generation domains during spindle positioning. *Dev. Biol.* 315, 42–54.
- Parmentier, M.L., Woods, D., Greig, S., Phan, P.G., Radovic, A., Bryant, P., and O'Kane, C.J. (2000). Rapsynoid/partner of inscuteable controls asymmetric division of larval neuroblasts in *Drosophila*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, RC84.
- Pease, J.C., and Tirnauer, J.S. (2011). Mitotic spindle misorientation in cancer--out of alignment and into the fire. *J. Cell Sci.* 124, 1007–1016.
- Pecreaux, J., Röper, J.-C., Kruse, K., Jülicher, F., Hyman, A.A., Grill, S.W., and Howard, J. (2006). Spindle Oscillations during Asymmetric Cell Division Require a Threshold Number of Active Cortical Force Generators. *Curr. Biol.* 16, 2111–2122.
- Peyre, E., Jaouen, F., Saadaoui, M., Haren, L., Merdes, A., Durbec, P., and Morin, X. (2011). A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells. *J. Cell Biol.* 193, 141–154.

Praitis, V., Casey, E., Collar, D., and Austin, J. (2001). Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 157, 1217–1226.

Radulescu, A.E., and Cleveland, D.W. (2010). NuMA after 30 years: the matrix revisited. *Trends Cell Biol.* 20, 214–222.

Rappleye, C.A., Tagawa, A., Lyczak, R., Bowerman, B., and Aroian, R.V. (2002). The anaphase-promoting complex and separin are required for embryonic anterior-posterior axis formation. *Dev. Cell* 2, 195–206.

Rappleye, C.A., Tagawa, A., Le Bot, N., Ahringer, J., and Aroian, R.V. (2003). Involvement of fatty acid pathways and cortical interaction of the pronuclear complex in *Caenorhabditis elegans* embryonic polarity. *BMC Dev. Biol.* 3, 8.

Redemann, S., Pecreaux, J., Goehring, N.W., Khairy, K., Stelzer, E.H.K., Hyman, A.A., and Howard, J. (2010). Membrane invaginations reveal cortical sites that pull on mitotic spindles in one-cell *C. elegans* embryos. *PLoS One* 5, e12301.

Redemann, S., Schloissnig, S., Ernst, S., Pozniakowsky, A., Ayloo, S., Hyman, A.A., and Bringmann, H. (2011). Codon adaptation–based control of protein expression in *C. elegans*. *Nat. Methods* 8, 250–252.

Reinsch, S., and Gönczy, P. (1998). Mechanisms of nuclear positioning. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 16), 2283–2295.

Riche, S., Zouak, M., Argoul, F., Arneodo, A., Pecreaux, J., and Delattre, M. (2013). Evolutionary comparisons reveal a positional switch for spindle pole oscillations in *Caenorhabditis* embryos. *J. Cell Biol.* 201, 653–662.

Robert, V.J.P., Katic, I., and Bessereau, J.-L. (2009). Mos1 transposition as a tool to engineer the *Caenorhabditis elegans* genome by homologous recombination. *Methods San Diego Calif* 49, 263–269.

Rose, L., and Gönczy, P. (2014). Polarity establishment, asymmetric division and segregation of fate determinants in early *C. elegans* embryos. *WormBook Online Rev. C Elegans Biol.* 1–43.

Roszko, I., Afonso, C., Henrique, D., and Mathis, L. (2006). Key role played by RhoA in the balance between planar and apico-basal cell divisions in the chick neuroepithelium. *Dev. Biol.* 298, 212–224.

Saadaoui, M., Machicoane, M., di Pietro, F., Etoc, F., Echard, A., and Morin, X. (2014). Dlg1 controls planar spindle orientation in the neuroepithelium through direct interaction with LGN. *J. Cell Biol.* 206, 707–717.

Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Knoblich, J.A. (2000). A protein complex containing Inscuteable and the G α -binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 10, 353–362.

- Schierenberg, E. (1987). Reversal of cellular polarity and early cell-cell interaction in the embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **122**, 452–463.
- Schierenberg, E. (2001). Three sons of fortune: early embryogenesis, evolution and ecology of nematodes. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **23**, 841–847.
- Schonegg, S., and Hyman, A.A. (2006). CDC-42 and RHO-1 coordinate acto-myosin contractility and PAR protein localization during polarity establishment in *C. elegans* embryos. *Dev. Camb. Engl.* **133**, 3507–3516.
- Ségalen, M., Johnston, C.A., Martin, C.A., Dumortier, J.G., Prehoda, K.E., David, N.B., Doe, C.Q., and Bellaïche, Y. (2010). The Fz-Dsh Planar Cell Polarity Pathway Induces Oriented Cell Division via Mud/NuMA in *Drosophila* and Zebrafish. *Dev. Cell* **19**, 740–752.
- Seth, M., Shirayama, M., Gu, W., Ishidate, T., Conte, D., and Mello, C.C. (2013). The *C. elegans* CSR-1 argonaute pathway counteracts epigenetic silencing to promote germline gene expression. *Dev. Cell* **27**, 656–663.
- Shirayama, M., Seth, M., Lee, H.-C., Gu, W., Ishidate, T., Conte, D., and Mello, C.C. (2012). piRNAs Initiate an Epigenetic Memory of Nonself RNA in the *C. elegans* Germline. *Cell* **150**, 65–77.
- Siegrist, S.E., and Doe, C.Q. (2005). Microtubule-Induced Pins/Gαi Cortical Polarity in *Drosophila* Neuroblasts. *Cell* **123**, 1323–1335.
- Siegrist, S.E., and Doe, C.Q. (2006). Extrinsic cues orient the cell division axis in *Drosophila* embryonic neuroblasts. *Dev. Camb. Engl.* **133**, 529–536.
- Siller, K.H., Cabernard, C., and Doe, C.Q. (2006). The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat. Cell Biol.* **8**, 594–600.
- Skop, A.R., and White, J.G. (1998). The dynactin complex is required for cleavage plane specification in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Curr. Biol.* **8**, 1110–1117.
- Smith, N.R., and Prehoda, K.E. (2011). Robust Spindle Alignment in *Drosophila* Neuroblasts by Ultrasensitive Activation of Pins. *Mol. Cell* **43**, 540–549.
- Song, J., Hirschman, J., Gunn, K., and Dohlman, H.G. (1996). Regulation of membrane and subunit interactions by N-myristoylation of a G protein alpha subunit in yeast. *J. Biol. Chem.* **271**, 20273–20283.
- Srinivasan, D.G., Fisk, R.M., Xu, H., and van den Heuvel, S. (2003). A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signaling and spindle function in *C. elegans*. *Genes Dev.* **17**, 1225–1239.
- Stein, L.D., Bao, Z., Blasiar, D., Blumenthal, T., Brent, M.R., Chen, N., Chinwalla, A., Clarke, L., Clee, C., Coghlan, A., et al. (2003). The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS Biol.* **1**, E45.

- Sternberg, P.W., and Horvitz, H.R. (1982). Postembryonic nongonadal cell lineages of the nematode *Panagrellus redivivus*: description and comparison with those of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **93**, 181–205.
- Sulston, J.E., and Brenner, S. (1974). The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 95–104.
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., and Thomson, J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **100**, 64–119.
- Tio, M., Zavortink, M., Yang, X., and Chia, W. (1999). A functional analysis of inscuteable and its roles during *Drosophila* asymmetric cell divisions. *J. Cell Sci.* **112** (Pt 10), 1541–1551.
- Tsai, M.-C., and Ahringer, J. (2007). Microtubules are involved in anterior-posterior axis formation in *C. elegans* embryos. *J. Cell Biol.* **179**, 397–402.
- Tsou, M.-F.B., Hayashi, A., DeBella, L.R., McGrath, G., and Rose, L.S. (2002). LET-99 determines spindle position and is asymmetrically enriched in response to PAR polarity cues in *C. elegans* embryos. *Dev. Camb. Engl.* **129**, 4469–4481.
- Tsou, M.-F.B., Hayashi, A., and Rose, L.S. (2003). LET-99 opposes Galpha/GPR signaling to generate asymmetry for spindle positioning in response to PAR and MES-1/SRC-1 signaling. *Dev. Camb. Engl.* **130**, 5717–5730.
- Verster, A.J., Ramani, A.K., McKay, S.J., and Fraser, A.G. (2014). Comparative RNAi screens in *C. elegans* and *C. briggsae* reveal the impact of developmental system drift on gene function. *PLoS Genet.* **10**, e1004077.
- Van der Voet, M., Berends, C.W.H., Perreault, A., Nguyen-Ngoc, T., Gönczy, P., Vidal, M., Boxem, M., and van den Heuvel, S. (2009). NuMA-related LIN-5, ASPM-1, calmodulin and dynein promote meiotic spindle rotation independently of cortical LIN-5/GPR/Galpha. *Nat. Cell Biol.* **11**, 269–277.
- Wallenfang, M.R., and Seydoux, G. (2000). Polarization of the anterior-posterior axis of *C. elegans* is a microtubule-directed process. *Nature* **408**, 89–92.
- Wang, C., Li, S., Januschke, J., Rossi, F., Izumi, Y., Garcia-Alvarez, G., Gwee, S.S.L., Soon, S.B., Sidhu, H.K., Yu, F., et al. (2011). An Ana2/Ctp/Mud Complex Regulates Spindle Orientation in *Drosophila* Neuroblasts. *Dev. Cell* **21**, 520–533.
- Wiegner, O., and Schierenberg, E. (1998). Specification of gut cell fate differs significantly between the nematodes *Acrobeloides nanus* and *caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **204**, 3–14.
- Wodarz, A., and Näthke, I. (2007). Cell polarity in development and cancer. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1016–1024.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U., and Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 544–547.

Wu, J.-C., and Rose, L.S. (2007). PAR-3 and PAR-1 inhibit LET-99 localization to generate a cortical band important for spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4470–4482.

Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X., and Chia, W. (2000). Analysis of partner of inscuteable, a novel player of *Drosophila* asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell* **100**, 399–409.

Yu, F., Morin, X., Kaushik, R., Bahri, S., Yang, X., and Chia, W. (2003). A mouse homologue of *Drosophila* pins can asymmetrically localize and substitute for pins function in *Drosophila* neuroblasts. *J. Cell Sci.* **116**, 887–896.

Zhao, Z., Boyle, T.J., Bao, Z., Murray, J.I., Mericle, B., and Waterston, R.H. (2008). Comparative analysis of embryonic cell lineage between *Caenorhabditis briggsae* and *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **314**, 93–99.

Zhao, Z., Flibotte, S., Murray, J.I., Blick, D., Boyle, T.J., Gupta, B., Moerman, D.G., and Waterston, R.H. (2010). New Tools for Investigating the Comparative Biology of *Caenorhabditis briggsae* and *C. elegans*. *Genetics* **184**, 853–863.

Zhu, J., Wen, W., Zheng, Z., Shang, Y., Wei, Z., Xiao, Z., Pan, Z., Du, Q., Wang, W., and Zhang, M. (2011). LGN/mInsc and LGN/NuMA complex structures suggest distinct functions in asymmetric cell division for the Par3/mInsc/LGN and Gai/LGN/NuMA pathways. *Mol. Cell* **43**, 418–431.

Zigman, M., Cayouette, M., Charalambous, C., Schleiffer, A., Hoeller, O., Dunican, D., McCudden, C.R., Firnberg, N., Barres, B.A., Siderovski, D.P., et al. (2005). Mammalian inscuteable regulates spindle orientation and cell fate in the developing retina. *Neuron* **48**, 539–545.

Zipperlen, P., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., and Ahringer, J. (2001). Roles for 147 embryonic lethal genes on *C.elegans* chromosome I identified by RNA interference and video microscopy. *EMBO J.* **20**, 3984–3992.

Abstract

Comparative study of the mitotic spindle positioning in *C. elegans* and *C. briggsae* species

Asymmetric cell division is a fundamental mechanism essential in all organisms to assure cell diversity, stem cell renewal and cellular identity maintenance. It is relying on proper mitotic spindle positioning because it dictates the cell division plan.

In *C. elegans* one-cell embryos, the first division is asymmetric and gives rise to two daughter cells of unequal size and fate. It occurs in two steps: pronuclei centration during prophase and spindle posterior displacement during anaphase. During anaphase, the mitotic spindle undergoes transverse oscillations that are more pronounced for the posterior than the anterior pole. These movements are controlled by pulling forces acting on astral microtubules. The force generators are identified and are evolutionary conserved. A complex made of Gα proteins, linked to GPR (a GoLoco containing protein, the LGN/Pins homologues), LIN-5 (a coiled-coil protein, the NuMA/Mud homologues) and dynein is thought to be anchored at the cortex and activated at the onset of mitosis to pull on the spindle.

We identified variations in spindle trajectories by analyzing the outwardly similar one-cell stage embryo of a close relative of *C. elegans*, *C. briggsae*. Compared to *C. elegans*, *C. briggsae* embryos exhibit an anterior shifting of nuclei in prophase and reduced anaphase spindle oscillations. By combining physical perturbations and mutant analysis in both species, we show that differences can be explained by inter-species changes in the regulation of the cortical Gα/GPR/LIN-5 complex. However, we uncover that in both species 1) a conserved positional switch controls the onset of spindle oscillations, 2) GPR posterior localization may set this positional switch, and 3) the maximum amplitude of spindle oscillations is determined in part by the time spent in the oscillating phase. Interestingly, GPR is poorly conserved at the amino acid level between these species. We use these variants to correlate phenotypes, GPR localization and sequence divergence to identify GPR regulatory elements. To this end, we performed protein replacement between species, as well as analysis of protein chimeras. Finally we tried to use optogenetics in order to control GPR localisation temporally and analyze the consequences on pronuclei and spindle movements during the first division. By investigating microevolution of a subcellular process, we identified new mechanisms that are instrumental to decipher spindle positioning.

Key Words: Asymmetric cell division; Spindle positioning; Nematodes; GPR; Evolutionary Cell Biology

Résumé

Étude comparative du positionnement du fuseau mitotique dans les espèces *C. elegans* et *C. briggsae*

La division cellulaire asymétrique est un mécanisme fondamental qui assure la diversité cellulaire, le renouvellement des cellules souches et le maintien de l'identité cellulaire. Elle dépend du bon positionnement du fuseau mitotique car il dicte le plan de division des cellules.

La première division des embryons de *C. elegans*, est asymétrique et génère deux cellules fille de taille et devenir différents. Elle consiste en deux étapes : la centration des pronoyaux en prophase puis le déplacement postérieur du fuseau mitotique en anaphase. Lors de l'anaphase le fuseau subit des oscillations transverses plus marquées au pôle postérieur qu'au pôle antérieur. Ces mouvements sont contrôlés par des forces de traction agissant sur les microtubules astraux. Les générateurs de force ont été moléculairement identifiés et sont évolutivement très conservés. Un complexe composé de protéines G α , liées à GPR (protéine à domaine GoLoco, homologue de LGN/Pins), à LIN-5 (protéine à domaine super-enroulé, homologue de NuMA/Mud) et à la dynéine serait ancré au cortex et activé en début de mitose pour tirer le fuseau.

En analysant la première division d'une espèce proche de *C. elegans* : *C. briggsae*, on observe des variations de trajectoire du fuseau. Les embryons de *C. briggsae* présentent un décalage antérieur des noyaux en prophase et les oscillations du fuseau sont réduites en anaphase. La combinaison de perturbations physiques et l'analyse de mutants dans ces espèces, ont montré que ces différences s'expliquent par des changements dans la régulation du complexe ternaire. Mais, nous avons découvert que dans les deux espèces 1) un switch positionnel conservé contrôle le démarrage des oscillations du fuseau, 2) la localisation postérieure de GPR détermine ce switch positionnel, et 3) l'amplitude maximum des oscillations est déterminée en partie par le temps passé dans la phase oscillatoire.

Nous avons utilisés ces variants pour corrélérer les phénotypes, la localisation de GPR et la divergence de séquence entre espèces afin d'identifier les éléments de régulation de cette protéine. Nous avons alors échangé les protéines et construits des protéines chimères entre les deux espèces. Enfin, par optogénétique, nous avons essayé de contrôler la localisation temporelle de GPR et analyser les conséquences sur les mouvements des noyaux et du fuseau.

En étudiant la microévolution d'un processus sous-cellulaire, nous avons identifié de nouveaux mécanismes qui contribuent à la compréhension du positionnement du fuseau.

Mots-clés: Division cellulaire asymétrique; Positionnement du fuseau, Nématodes; GPR; Évolution des processus cellulaires.